

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lyon

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(Mention Sciences)

par

Evangelos FYTISAS

Première thèse :

**RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES ET TOXICOLOGIQUES
SUR LES EFFETS DU POLYCHLOROCAMPHANE CHEZ
LES INSECTES**

Deuxième thèse :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Soutenues le 3 Janvier 1964
devant la Commission d'examen :**

MM. NIGON, Président

CHOPIN,

LEGAY, Examineurs

Professeurs honoraires

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honorairesMM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, DOUIN
Henri EYRAUD, DEJARDIN, VIRET.Professeurs

M. BRACONNIER

Professeurs

MM. MESNARD, BOIDIN.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON

PRETTE

COURTY

KUHNER

MALECOT

PARIS

AUMERAS

COLONGE

JANIN

FLANDRIN

BERNARD

DUFAY Jean

NIGON

GAUTHIER Henri

WAUTIER

CHOPIN

CUEILLERON

BRACONNIER

EYRAUD Charles

SARAZIN

BOIDIN

PERES

MESNARD

GRANDMONTAGNE

BOUTILLIER

LAFOUCRIERE

DREUX

TEICHNER

PAVANS de CECCATTY

MERLIN

DUFAY Maurice

FRAISSE

LUBET

PHILBERT

COHEN-ADAD

DAVID Louis

CHANEL

MAURY

Minéralogie

Chimie industrielle

Chimie-Physique

Botanique

Mécanique rationnelle et appliquée

Chimie minérale

Chimie

Chimie organique

Physique expérimentale

Géologie appliquée

Physique industrielle

Astronomie

Zoologie expérimentale

Géologie générale

Zoologie

Chimie biologique

Chimie

Calcul différentiel et intégral

Chimie-Physique appliquée

Physique nucléaire

Microbiologie et Mycologie

Physiologie

Electronique

Physique

Minéralogie

Physique

Chimie organique

Chimie industrielle

Zoologie

Chimie analytique

Physique de l'Atmosphère

Mathématiques

Physiologie

Physique nucléaire

Chimie

Géologie Générale

Psychophysiologie

Méthodes Mathématiques de la physique

Professeurs sanstitre

MM. GAUME

DEPRAZ

FERON

LAFORGUE

LEGAY

UZAN

GAUTHIER Jean

CHENEVOY

GINET

ASCH

Physique

Physique nucléaire

Mathématiques

Physique

Zoologie expérimentale S.P.C.N.

Physique S.P.C.N.

Chimie

Géologie appliquée

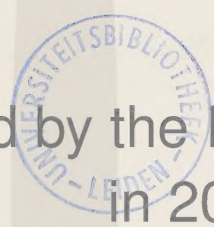
Zoologie

Physique

	MM. MICHEL Pierre DUCET	Minéralogie Biologie végétale
<u>Maîtres de Conférences</u>	Mle MAITROT	Physique
	Mme ERICSON	Physique générale
	GEVIN	Géologie générale
	PONASSE	Mathématiques
	D'INCAN	Physique
	MARTEL	Mécanique
	LEFEBVRE	Mathématiques
	PERNET	Mathématiques
	CHERY	Physique
	BERGEON	Physique C.S.U.
	Mle GAUTHERON	Chimie Biologique
	MATHIEU	Mécanique des Fluides
	ERBEIA	Physique
	DESCOTES	Chimie organique
	PICARD Philippe	Mathématiques
	LEMOIGNE	Botanique
	DEMARCO	Géologie générale
	MICHEL Georges	Biochimie
	LEBRETON	Biologie végétale
	DAVID Jean	Biologie animale
	TOUSSET	Chimie propédeutique
	FEUVRAIS Louis	Physique Electricité
	FICARD Claude	Mathématiques
<u>Maître de Conférences adjoint.</u>	M. PIERRON	Chimie
<u>Secrétaire Principal Honoraire</u>	M. ROUX	
<u>Conseiller Administra- tif.</u>	M. BURNET	



Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41554221_0031

- AVANT PROPOS -

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. le Professeur NIGON qui a bien voulu accepter la présidence et mon jury de thèse.

M. le Professeur LEGAY a suivi mon travail, m'a conseillé, encouragé, il a droit à ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à M. le Professeur CHOPIN qui a guidé et corrigé la partie chimique de ce travail.

C'est au Laboratoire de Phytopharmacie de l'INRA que j'ai poursuivi l'étude qui fait l'objet du présent mémoire. Toute ma reconnaissance va à M. le Directeur de l'INRA qui m'a accepté dans un des laboratoires de l'Institut. Je dois encore lui exprimer ma gratitude pour la bourse qu'il m'a octroyée et qui m'a permis d'achever mon travail.

Ma reconnaissance va encore à M. VIEL qui m'a accueilli au Laboratoire de Phytopharmacie qu'il dirige, qui m'a donné ce sujet de travail et qui m'a soutenu de ses conseils, à M. HASCOET qui a suivi mes recherches, m'a guidé et dont l'amitié m'a été un soutien constant, à tous mes collègues du Laboratoire de Phytopharmacie et en particulier M. COULON qui m'ont si amicalement accepté comme un des leurs.

M. le Professeur LE BERRE voudra bien accepter mes remerciements chaleureux pour l'intérêt qu'il m'a manifesté et les précieux encouragements qu'il m'a prodigués.

Je dois encore dire tout ce que je dois à mes Maîtres de l'INSTITUT AGRONOMIQUE D'ATHENES, et en particulier à M. le Professeur ROUSSOPOULOS qui ont éveillé ma vocation scientifique, et je n'oublierai pas le gouvernement hellénique qui grâce à la bourse qu'il m'a attribuée, m'a permis de poursuivre mes études en France.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	I
---------------------------	---

P A R T I E I

=====

Essais d'obtention de produits purs à partir du mélange appelé polychlorocamphane.

<u>A - ETUDES CHIMIQUES.</u>	4
------------------------------------	---

I - <u>Définition</u>	4
-----------------------------	---

2 - <u>Différence entre Polychlorocamphane et Toxaphène</u>	4
---	---

3 - <u>Propriétés du Polychlorocamphane</u>	6
---	---

B - METHODES ANALYTIQUES.

I - <u>Titrage du chlore total</u>	7
--	---

2 - <u>Méthode colorimétrique</u>	9
---	---

C - FRACTIONNEMENT.

15

I - <u>Séparation par chromatographie</u>	15
---	----

D - CONCLUSION.

31

P A R T I E II

=====

Etude comparative du pouvoir insecticide du Polychlorocamphane et de deux produits de séparation.

<u>A - CONDITIONS EXPERIMENTALES.</u>	33
---	----

I - <u>Les insectes utilisés</u>	33
--	----

2 - <u>Les méthodes utilisées</u>	36
---	----

3 - <u>Nombre des insectes utilisés</u>	42
---	----

.../...

<u>B - LES RESULTATS.</u>	44
<u>C - ANALYSE STATISTIQUE.</u>	54
1 - <u>Correction de la mortalité observée</u>	54
2 - <u>Transformation des variables</u>	54
3 - <u>Régression de la courbe en ligne droite</u>	55
4 - <u>Calcul de la ligne de régression</u>	56
5 - <u>Exemple numérique</u>	59
6 - <u>Comparaisons des courbes</u>	61
<u>D - CONCLUSIONS.</u>	63

P A R T I E I I I

=====

Travaux sur l'intoxication au Polychlorocamphane chez divers insectes.

<u>A - INFLUENCE DU MODE D'APPLICATION SUR LA TOXICITE.</u>	66
1 - <u>Méthodes utilisées</u>	68
2 - <u>Résultats</u>	70
3 - <u>Conclusions</u>	73
<u>B - TRAVAUX ANNEXES.</u>	73
1 - <u>Etude histologique de l'action sur l'epithélium intestinal</u>	74
2 - <u>Action sur les battements du coeur</u>	75
<u>C - ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE L'INTOXICATION.</u>	78
1 - <u>Symptomatologie</u>	78
2 - <u>Action sur les phénomènes respiratoires</u>	83

.../....

.... / ...

A) - <u>Absorption d'oxygène</u>	84
a) - Méthode utilisée	84
b) - Les essais	85
c) - Les résultats	86
d) - Conclusions	95
B) - <u>Le quotient respiratoire</u>	95
a) - Méthode utilisée	96
b) - Les résultats	100
c) - Précision de la méthode	103
d) - Discussion	104
CONCLUSIONS	107
=====	
BIBLIOGRAPHIE	III
=====	

— : — : — : — : — : — : — : — : — : — : — :

L'évolution des techniques culturelles d'une part, et l'accroissement des échanges internationaux d'autre part, ont en effet grandement favorisé le développement des insectes indigènes et provoqué l'apparition des espèces étrangères dont l'adaptation s'est parfois faite rapidement.

La lutte chimique est alors apparue comme l'arme de choix surtout dès que les recherches entreprises au moment de la seconde guerre mondiale eurent permis la découverte d'insecticides de synthèse, polyvalents, efficaces et relativement peu toxiques pour l'homme et les animaux supérieurs.

C'est ainsi que des chercheurs américains et français songèrent à utiliser les produits terpéniques.

.....

.../...

En 1948 la firme "Herculous Powder Co" proposait un insecticide de cette série : le Toxaphène.

Vers la même époque des laboratoires français examinaient les propriétés d'un produit terpénique chloré dont la composition centésimale correspondait à celle du trichlorocamphane.

Le produit présentait quelques propriétés insecticides mais ne pouvait concurrencer le toxaphène (Essais de Desalbres et de Rache, 1948). Les expériences du laboratoire de Phytopharmacie de Versailles sur les larves de Doryphores donnaient les résultats suivants : (VIEL, 1948, non publiés).

<u>INSECTICIDE</u>	<u>MORTALITE DES LARVES</u>			
	<u>1 jour</u>	<u>2 jours</u>	<u>3 jours</u>	<u>4 jours</u>
dre à 10 % de Toxaphène	20	80	100	
5 % de Toxaphène	20	20	90	90
10 % de Trichlorocamphane	10	27	60	70

Une chloruration plus poussée permit d'obtenir une substance à teneur en chlore plus élevée ; le Polychlorocamphane ou P.C.C.

Ce nouvel insecticide trouva un débouché important dans la lutte contre les insectes du colza quand il fut démontré qu'il possédait une bonne efficacité contre ces ravageurs et qu'il était sans danger pour les abeilles qui, au moment des traitements, viennent butiner dans les champs déjà fleuris.

..../....

Si quelques essais insecticides ont mis en évidence vers 1951 l'intérêt de ce produit, son étude en resta très partielle et vers 1955 D.Cuériaux pouvait constater l'absence de documents de base. Il convient en effet de remarquer que les publications antérieures de Desalbres concernent le trichlorocamphane, le tétrachloroparamenthane ou d'autres composés moins chlorés.

Le P.C.C. se rapproche du Toxaphène mais on ne peut à priori confondre ces deux produits chlorés qui diffèrent par leur mode de préparation et leurs caractéristiques.

Une étude du Polychlorocamphane restait donc à faire. C'est l'objet du travail que nous avons entrepris.

Le Polychlorocamphane étant un mélange, nous nous étions proposés d'isoler des constituants et de comparer leurs propriétés biologiques à celles du produit de départ.

Nous n'avons pu cependant obtenir des constituants purs, et nous avons dû limiter notre étude à la comparaison des fractions séparées à partir d'un produit technique.

Dans une première partie nous présentons quelques caractéristiques chimiques que nous avons mises en évidence, nous exposons les techniques qui nous ont permis de fractionner le produit brut et les méthodes analytiques que nous avons employées pour suivre le fractionnement.

Une seconde partie se rapporte à la présentation des résultats obtenus dans l'étude des propriétés insecticides du produit brut et des fractions isolées sur plusieurs espèces d'insectes.

Enfin dans une troisième partie nous exposons un ensemble de recherches se rapportant plus particulièrement au mode d'action du Polychlorocamphane sur quelques insectes.

Essais d'obtention de produits purs à partir du mélange appelé polychlorocamphane.

A. - ETUDES CHIMIQUES.

I - DEFINITION

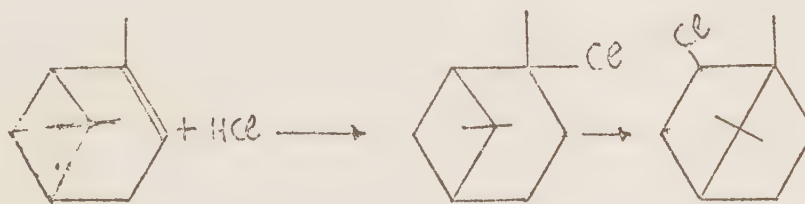
Le Polychlorocamphane (P.C.C.) est un mélange d'hydrocarbures chlorés titrant 62 à 64 pour cent de chlore, obtenu par chloruration photochimique du chlorure de bornyle dissous dans un solvant approprié.

2 - DIFFERENCE ENTRE LE POLYCHLOROCAMPHANE ET LE TOXAPHENE.

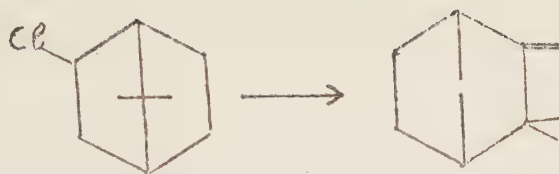
Le Toxaphène est également un mélange d'hydrocarbures chlorés obtenu par chloruration du camphène mais son titre en chlore atteint 67 à 69 pour cent.

On constate donc que le produit initial, soumis à l'action du chlore n'est pas le même, et que d'autre part la teneur en chlore du Toxaphène est plus élevée que celle du Polychlorocamphane.

Le chlorure de bornyle produit de départ de la fabrication du PCC est obtenu par action de l'acide chlorhydrique anhydre sur l'essence de térébenthine, avec formation intermédiaire d'un chlorure de pinène. L'essence de térébenthine est un mélange d' α -pinène et de β -pinène en proportion variable selon l'espèce botanique des pins producteurs.



Le camphène est préparé par déshalogénation du chlorure de bornyle :



Le passage du chlorure de bornyle au camphène peut laisser supposer que la combinaison du chlore avec l'un ou l'autre de ces composés donne, par le jeu des additions, des substitutions et des transpositions, des produits complexes dont certains constituants sont identiques mais qui dans l'ensemble sont cependant différents.

L'action du chlore sur le pinène a fait l'objet d'études déjà anciennes.

En 1840 Deville signalait que l'essence de térébenthine absorbe le chlore. En 1915 Aschan montre que la réaction donne du chlorure de bornyle, un dichlorure liquide et un dérivé dichloré solide que l'on a identifié comme étant le dichloro-3,5-camphane ou chlorure de tricyclène.

Papasogli (20) signale la formation d'un dichlorure par action du chlore sur le chlorure de bornyle. Aschan obtient par la même réaction du trichloro-camphane et du tétrachlorocamphane. Desalbres et Rache (20) préparent quant à eux du trichloro-2,6,7-camphane par action du chlore sur une solution de chlorure de bornyle à la lumière solaire.

La chloruration peut encore être plus poussée puisqu'il est possible de fixer 72 pour cent de chlore en choisissant convenablement les conditions de la réaction.

Le P.C.C. serait composé de dérivés hexachlorés ($C_{10}H_{12}Cl_6$), 61,7 % Cl et heptachlorés ($C_{10}H_{11}Cl_7$), 65,5 % Cl; la chloruration étant arrêtée à 50 ± 1 pour cent.

La composition du toxaphène correspondait sensiblement à celle du dérivé octachloré (68,2 % Cl).

Finalement les laboratoires PROCIDA considèrent que les différences entre P.C.C. et Toxaphène tiennent à :

- 1° - Une teneur en chlore moins élevée
- 2° - Un certain pouvoir rotatoire que ne possède pas le Toxaphène
- 3° - L'absence de réaction colorée du P.C.C avec la pyridine additionnée d'alcoolate de sodium.

3 - PROPRIETES DU POLYCHLOROCAMPHANE.

Le P.C.C. est un solide blanc crème, insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool froid, soluble dans le benzène, l'hexane, l'éther et autres solvants organiques.

Son point de fusion (tube capillaire) est mal défini (127 à 139° C).

Il subit une déshalogénéation partielle par action de la potasse alcoolique à l'ébullition ; il perd ainsi 10,1 à 15 % de chlore selon les lots de fabrication (Procida, D.R.T. DAK).

Au laboratoire l'échantillon sur lequel nous avons travaillé subissait dans ces conditions une déshalogénéation de 12,3 %.

Le chauffage en présence d'une solution alcoolique de monoéthanolamine libère dans le cas de notre échantillon 2,73 % de chlore.

B. - METHODES ANALYTIQUES

I - TITRAGE DU CHLORE TOTAL.

Le P.C.C. étant constitué d'un mélange de corps chlorés, la méthode de contrôle qui nous semblait la mieux adaptée était la détermination de la teneur en chlore total.

La détermination de cette teneur en chlore total a été établie en utilisant une technique dérivée de la méthode de Stepanov (action du sodium sur une solution alcoolique de l'insecticide).

Description de la méthode.

Cette méthode est assez universelle. Nous l'avons utilisée en ~~memi~~microdosage pour contrôler la méthode colorimétrique, que nous décrivons plus loin et qui repose sur l'existence dans la molécule de substitutions chlorées particulières.

Afin d'obtenir des résultats fidèles nous avons dû préciser, cependant, certaines conditions opératoires.

Stepanov (67) procédait à une minéralisation par ébullition à reflux dans l'éthanol en présence de sodium métallique.

Mais dans le cas des insecticides chlorés, ayant des noyaux cycliques les ions chlore sont solidement liés à la molécule.

Dans ces conditions étant donné la température d'ébullition peu élevée et la rapidité de la réaction entre le sodium et l'éthanol, la réduction de chlore est incomplète. Cette méthode a donc été modifiée en remplaçant l'éthanol par des alcools moins réactifs et de point d'ébullition supérieur.

C'est ainsi que Umhoefer (7I) utilise l'alcool isopropylique ou l'alcool isobutylique.

Cette méthode fut à nouveau modifiée au laboratoire afin d'accroître sa sensibilité. Dans ce but on a substitué le butanol normal à l'isopropanol. Le butanol étant peu miscible à l'eau permet d'éliminer certaines colorations parasites solubles dans cet alcool qui apparaissent au cours du dosage de certains produits insecticides.

De plus Prat (non publié) ayant recommandé de porter à six heures, la durée d'ébullition pour des insecticides de structure voisine, c'est cette valeur que nous avons retenue.

Mode opératoire.

50 mg de Polychlorocamphane étaient introduits dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, et dissous dans 50cc de butanol. On ajoutait ensuite 2 gr de sodium métallique.

L'ébullition à reflux durait 6 heures.

Après 10 minutes de refroidissement nous acidifions le milieu par l'acide nitrique et ajoutons une quantité connue et son excès de nitrate d'argent N/10. Cet excès était titré en retour au moyen de sulfocyanure de potassium N/10 en présence d'alun de fer comme indicateur.

..../....

Résultats obtenus.

Dans ces conditions voisi les résultats que nous avons obtenus au cours de trois dosages successifs. :

64,2 % de chlore

64,3 % -

64,6 % -

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par la firme qui fabrique cet insecticide.

2 - METHODE COLORIMETRIQUE.

Nos expériences de fractionnement sur colonne que nous exposerons ci-après, nécessitaient de pouvoir suivre l'élution de petites quantités de constituants. Il nous fallait avoir à notre disposition une méthode plus sensible que celle reposant sur le dosage du chlore total.

Il n'a pas été publié de méthode colorimétrique pour le Polychlorocamphane. Cependant comme il est fort vraisemblable qu'il existe dans la molécule des groupes trichlorométhyle, on pouvait songer à appliquer la réaction de Fujiwara dont le principe est donné dans le paragraphe suivant.

C'est ce qui avait d'ailleurs été fait par Johnson (35) dans le cas du Toxaphène.

Cette réaction repose sur le même principe que celle déjà décrite par Zincke (82) dont les étapes principales ont été décrites par Mosher (59) dans le cas particulier d'I-chloro-2,4-dinitrobenzène. Ce composé réagit avec la pyridine pour donner un sel de pyridinium. En présence d'un alcali, le cycle pyridinique s'ouvre ; il se forme un composé aldéhydique dont les doubles liaisons sont responsables de l'apparition de la couleur.

Méthode de Johnson (35).

Cet auteur emploie la pyridine en milieu alcalin.

Le toxaphène conduirait en premier lieu à la formation d'un sel de pyridinium que l'hydrolyse alcaline scinderait en dérivé iminé.

Les réactifs utilisés par Johnson sont les suivants :

- pyridine pour analyse
- potasse méthanolique 0,1 N

La réaction est réalisée à chaud. Le tube à essai est plongé pendant 15 secondes dans un bain d'eau bouillante. Il y a apparition d'une couleur rose-violet. La sensibilité de cette méthode est d'environ 0,2 mg.

La méthode de Johnson, telle que nous l'avons décrite pour le dosage du toxaphène manque de sensibilité lorsqu'on l'applique au P.C.C. Selon PROCIDA cette réduction de la sensibilité serait d'ailleurs un des caractères qui permettent de différencier les deux insecticides.

Viel et Mathieu (travail non publié) ont modifié cette méthode afin de l'adapter au dosage des microquantités de P.C.C.

La principale modification a porté sur :

la concentration en alcali qui a été amenée à 40 %

Cet accroissement de la teneur en alcali a conduit les auteurs à opérer non plus en phase alcoolique, mais aqueuse.

Par ailleurs au cours d'essais que nous avons entrepris nous avons pu constater des irrégularités dans l'intensité de la teinte lorsqu'on ne prenait pas soin de contrôler le temps du chauffage. Nous avons alors étudié l'influence de ce facteur.

Pour une même quantité de P.C.C., soit 1 mg, voici les densités optiques que nous avons obtenues en fonction de la durée du chauffage.

TABLEAU I

TEMPS de chauffage	DENSITE optique
15 secondes	0,380
30 -	0,425
45 -	0,440
1 minute	0,452
2 -	0,464
5 -	0,475
10 -	0,478

Après 5 minutes la teinte n'augmente plus ; nous avons donc retenu cette valeur qui se trouve aussi être beaucoup plus longue que celle recommandée par Johnson.

Il est également important que la pyridine ne donne pas directement une coloration en présence de potasse. Pour cela il est nécessaire d'employer une pyridine récemment rectifiée. Il est également indispensable que la potasse employée ne soit pas carbonatée.

Nous avons définitivement adopté la méthode suivante :

Réactifs.

Pyridine RP fraîchement rectifiée

Potasse RP solution à 40 % préparée tous les jours

Méthanol RP

Mode opératoire.

- I - Une quantité convenable de P.C.C. (125 à 1.000 g) est introduite dans un tube à essai. Le solvant (hexane) est évaporé.
- 2 - On ajoute ensuite 2 ml de pyridine et 1 ml de KOH 40 %, le tube après agitation, est placé dans un bain marie d'eau bouillante. On agite de temps en temps. La durée de chauffage est de 5 minutes très exactement.
- 3 - Aussitôt sorti du bain marie le tube est refroidi rapidement sous un courant d'eau froide ; on ajoute alors 2 ml de méthanol ce qui permet l'homogénéisation des deux phases.
- 4 - Après 10 minutes on lit l'intensité de la coloration à $375\text{m}\mu$ par rapport à un témoin sans P.C.C. La coloration est sensiblement stable pendant une dizaine de minutes.

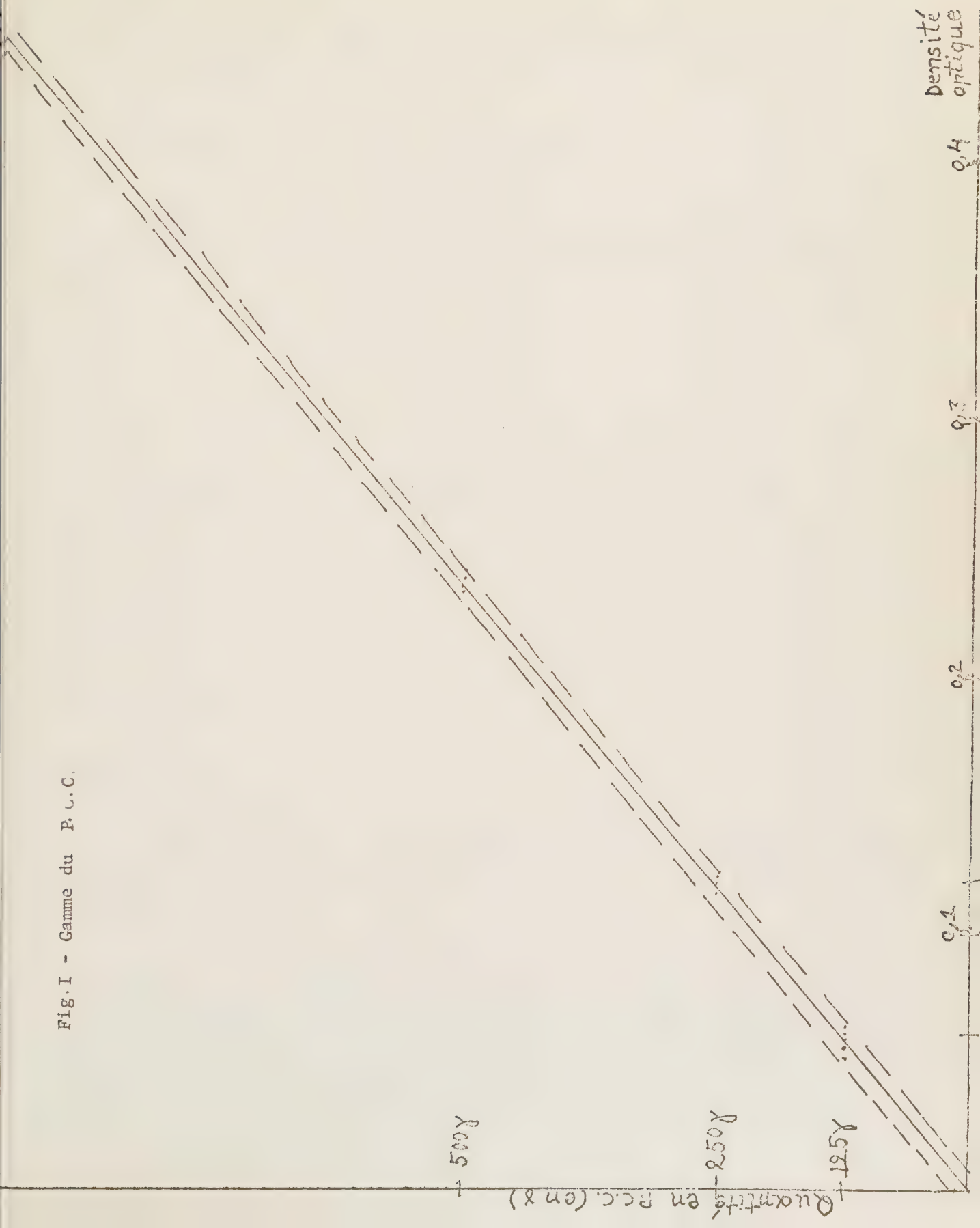
Courbe d'étalonnage - Fidélité.

Une courbe d'étalonnage a été établie avec les quantités de 125, 250, 500 et 1.000 de P.C.C. Le tableau II contient les résultats de 5 déterminations.

TABLEAU II

QUANTITÉS C.C. (mg)	DENSITÉ OPTIQUE						Moyenne
	I	II	III	IV	V		
125	0,062	0,060	0,058	0,055	0,050	0,057	
250	0,120	0,118	0,116	0,120	0,120	0,119	
500	0,235	0,240	0,238	0,238	0,240	0,238	
1000	0,470	0,468	0,469	0,470	0,465	0,469	

Fig. I - Gamme du P. C. C.



Le graphique I permet de voir qu'il existe une relation linéaire entre les quantités de P.C.C dosées et les densités optiques obtenues, dans la gamme des valeurs étudiées.

La fidélité de la méthode est satisfaisante.

En respectant ces conditions opératoires deux analystes obtinrent pour des quantités de composé supérieur à 100 g des résultats différant au plus de 6 %.

TABLEAU III

<u>Quantités</u> (en µg)	<u>1ère expérimentation</u>	<u>2ème expérimentation</u>
200	0,094	0,089
300	0,142	0,139
500	0,238	0,232

Spécificité.

Cette méthode n'est pas spécifique ; plusieurs insecticides donnent plus ou moins rapidement une coloration : D.D.T., dieldrin, chlordane, de même quelques fongicides : captane, phaltane.

Par ailleurs comme nous l'avons déjà dit elle est caractéristique de certaines structures moléculaires en particulier des restes $-C Cl_2$; d'autre part l'hydrolyse de ces restes est plus ou moins malaisée selon le composé, le dosage colorimétrique des différents constituants du P.C.C. risquait donc de conduire à des résultats différents pour un mode opératoire identique.

Voici quelques résultats obtenus au cours du fractionnement et qui confirment cette hypothèse.

TABLEAU IV

	<u>TENEUR EN INSECTICIDE</u>	
	<u>Méthode colorimétrique</u>	<u>Méthode volumétrique</u> (Dosage du Cl total)
Fraction benzenique	725 γ	678 γ
"	675 γ	697 γ
"	750 γ	745 γ
Fraction éthérée	680 γ	360 γ
"	742 γ	474 γ

Dans le cas de la fraction benzénique, les résultats obtenus par les deux méthodes sont comparables.

Au contraire dans le cas de la fraction éthérée les résultats obtenus par la méthode colorimétrique sont de beaucoup supérieurs à ceux du dosage du chlore total. Cette différence semble être due à une coloration parasite.

C - FRACTIONNEMENT.

I - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Etant donné son mode de fabrication (chloruration d'un mélange de terpènes) et l'absence de point de fusion défini, le P.C.C. pouvait être considéré comme un mélange. Nous avons donc recherché une méthode qui permette un fractionnement plus ou moins poussé de ce mélange.

L'étude analytique a été menée selon les méthodes proposées par divers chercheurs à propos d'insecticides de structure voisine.

Les deux principales techniques utilisées ont été :

- 1) - la chromatographie sur papier
- 2) - la chromatographie sur silice (chromatoplaque)

Par la suite, afin de rendre possible la mise en oeuvre de tests biologiques nous avons dû opérer ce fractionnement à une échelle préparative en ayant recours à la chromatographie sur colonne.

I° - Chromatographie sur papier.

Mitchell, Patterson, Klein et autres⁽³⁸⁻⁴²⁾ ont travaillé sur la séparation d'un mélange de plusieurs insecticides chlorés, parmi lesquels figure le toxaphène, composé voisin du B.C.C.

Description de la méthode.

a) - Nature des éluants utilisés.

Les auteurs ont utilisé les paires de solvants suivants :

<u>PHASE STATIONNAIRE</u>	<u>PHASE MOBILE</u>
Dimethyl-formamide	Pentane
"	Hexane
"	Heptane
Huile de soja	Ethanol 95 %
"	Acetonitrile + H ₂ O 7:3 V/V
"	Pyridine + H ₂ O 3:2 V/V
"	Acetone + H ₂ O 4:1 V/V

Le papier utilisé était un Whatmann N°3. La quantité d'insecticides déposés était de $100\text{ }\mu\text{g}$, dissoute dans l'hexane.

Après le séchage de la tache, la partie inférieure du papier est trempée dans le solvant de la phase stationnaire jusqu'au bord de la tache de départ. Afin que le papier soit bien uniformément imprégné, le solvant est mélangé à l'éther éthylique à raison de 5 % pour l'huile de soja et 50 % pour la formamide (en volume).

On arrête l'élution dès que le front arrive à 15 cm du bord inférieur du papier, la distance parcourue étant d'environ 20 cm.

b) - Mode de révélation.

La révélation des taches est faite en pulvérisant successivement les réactifs suivants :

- Ag NO₃ 0,05 N
- Formaldéhyde 37 %
- KOH 2N
- Mélange d'HNO₃ et H₂O 1:1 V/V'

Il est indispensable de sécher le chromatogramme entre deux pulvérisations successives.

Après la pulvérisation à la potasse on procède à un séchage d'une durée de 30 minutes dans une étuve à 130° C. Les vapeurs de formaldéhyde dégagées de l'étuve rendent cette méthode fort incommode. C'est pourquoi, Mitchell () a modifié ultérieurement cette méthode en remplaçant les quatre réactifs précédemment utilisés par une solution de nitrate d'argent dans le 2-éthanolphenoxy.

.../...

Après séchage, les taches sont révélées sous une lampe à rayons U.V.
(Général Electric, type Germicide, puissance 30 watts).

La sensibilité de la méthode de Mitchell est pour le Toxaphène de 50 μ g
environ. Dans nos essais nous avons utilisé 100 μ g de P.C.C.

En utilisant ce procédé nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU V

PHASE MOBILE	R_F	PHASE MOBILE	R_F
ane	0,88	Ethanol 95 %	0,46
ne	0,78	Acetonitrile + eau 7:3 V/V	0,35-0,64
ane	0,70	Pyridine + eau 3:2 V/V	0,27
		Acetone + eau 4:1 V/V	0,12
stationnaire : dimethyl-formamide		Phase stationnaire : huile de soja	

Dans tous les cas, nous avons obtenu une seule tache à l'exception toutefois du mélange : acetonitrile-eau ; cependant les deux taches dans ce dernier cas étaient imparfaitement séparées.

2° - Chromatoplaques.

Kirchner, Miller et autres (37,45) ont utilisé les chromatoplaques pour la séparation et la détection des terpènes.

..../...

.../...

Les chromatoplaques sont constituées d'une couche mince d'acide silicique additionné d'eau et d'amidon étalée à la surface d'une plaque de verre.

Les chromatoplaques ainsi préparées sont ensuite activées à 105° C pendant 30 minutes. La tache de départ contient 100 μ g de P.C.C.

Nous avons dû employer de nombreuses combinaisons d'éluateurs. La durée de développement était dans tous les cas de 10 à 15 minutes. Après séchage, la révélation était faite selon la seconde méthode de Mitchell déjà décrite dans le paragraphe précédent.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABEAU VI

SOLVANTS		R _F
		0,46
+ Benzène	2 : 1	0,68
+ Benzène	1 : 1	0,76
+ Benzène	1 : 2	0,82
		0,92
		0,91
d'éthyle dans hexane 15 %		0,56

Dans tous les cas nous avons obtenu une seule tache mais très allongée. Il semble donc que le mélange en entier se déplace ; les éluateurs utilisés ne parviennent donc pas, dans ces conditions, à le fractionner.

.../...

Au cours d'une seconde série d'expérimentation nous avons utilisé l'acide silicique seul activé à 135°.

Dans ces conditions l'hexane ne parvient pas à détacher la totalité du produit de son point de départ. Tandis que l'emploi du benzène conduit comme dans le cas précédent à un Rf peu différent de l'unité.

3° - Chromatographie sur colonne.

Les résultats obtenus par ces différentes méthodes sont assez décevants.

Cependant dans certains cas nous avons pu observer un allongement voire même un dédoublement de la tache, confirmant le caractère complexe du Polychlorocamphane. Ceci nous a amené à conserver l'acide silicique comme substrat chromatographique.

De plus Rusk et Fahey (64) décrivent une méthode de séparation de l'heptachlor et du chlordan sur une colonne de silice. Ils utilisent comme éluant le pentane et l'éther éthylique.

Notre colonne était constituée de 100g d'acide silicique Mallinckrodt, 100 mesh, activé à 135° C pendant 24 heures. Le diamètre de cette colonne était de 3 cm. La charge en Polychlorocamphane était de 50 mg. Les éluants à utiliser furent choisis parmi ceux déjà expérimentés sur chromatoplaques.

C'est l'hexane qui fut donc tout d'abord employé. Nous avons fait passer 500 cc de ce solvant à l'aide d'une pression constante, soit de 0,25 kg/cm². La colonne était montée sur un collecteur automatique de fraction, (ERAL). Le réglage de cet appareil permettait la distribution d'une quantité constante et égale à 15 cm³ par tube.

Les quantités recueillies dans l'hexane étant très faibles, nous avons dû continuer l'élution avec des solvants dont le pouvoir éluant était plus grand.

.../...

Ces solvants furent choisis d'après la liste publiée par Jacques et Mathieu (34) en écartant toutefois ceux qui comportaient des atomes de chlore dans leur molécule.

Ainsi après l'élution à l'hexane suivait une seconde au benzène (500cc) et enfin une troisième à l'éther éthylique (500cc) ; la pression restait toujours égale à 0,25 kg/cm² .

Le nombre des tubes à essai se montait à 99, soit 33 tubes pour chaque fraction.

Après l'évaporation du solvant à l'air comprimé nous appliquions pour chaque tube le test de Fujiwara. La lecture de l'intensité de coloration était faite au spectrophotomètre (SAFAS) sous une épaisseur de 1 cm et à la longueur d'onde de 575 m μ

Les résultats figurent dans le tableau VII et les trois graphiques suivants (2,3,4).

La première fraction contenait une faible quantité de produit (3,25 %) En répétant l'expérience nous avons vu que cette quantité n'était pas constante elle oscillait entre 2 et 6 %. De plus, bien qu'il s'agissait d'un même lot de produit, la position des pics variait ; ceux-ci apparaissaient tantôt au commencement, tantôt au milieu et tantôt à la fin de l'élution ; ce qui peut faire penser à des impuretés de fabrication. Pourtant cette fraction n'est pas dépourvue d'action insecticide ; mais sa toxicité est variable.

Cette première fraction fut abandonnée pour nos essais biologiques pour lesquels une toxicité constante constitue une condition indispensable.

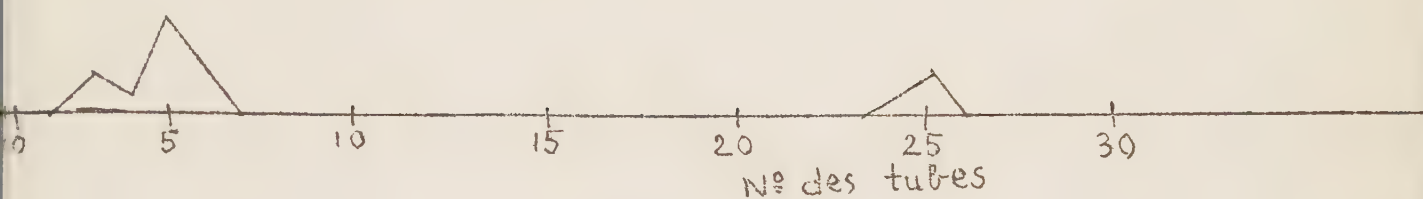
La seconde fraction qui passe dans le benzène est la plus importante.

.../...

TABLEAU VII

FRACTION HEXANIQUE			FRACTION BENZENIQUE			FRACTION ETHEREE		
Tube	Quantité en γ	N° du tube	Quantité en γ	N° du tube	Quantité en γ	N° du tube	Quantité en γ	N° du tube
1	-	1	-	1	-	1	-	1
2	-	2	-	2	-	2	-	2
3	250	3	-	3	-	3	-	3
4	125	4	-	4	-	4	-	4
5	250	5	-	5	-	5	-	5
6	-	6	-	6	-	6	-	6
7	-	7	-	7	-	7	-	7
8	-	8	8.000	8	-	8	-	8
9	-	9	12.000	9	-	9	-	9
10	-	10	7.750	10	250	10	250	10
11	-	11	4.500	11	550	11	550	11
12	-	12	2.500	12	4.150	12	4.150	12
13	-	13	2.800	13	825	13	825	13
14	-	14	500	14	825	14	825	14
15	-	15	300	15	600	15	600	15
16	-	16	200	16	850	16	850	16
17	-	17	300	17	600	17	600	17
18	-	18	-	18	375	18	375	18
19	-	19	-	19	-	19	-	19
20	-	20	-	20	-	20	-	20
21	-	21	-	21	-	21	-	21
22	-	22	-	22	-	22	-	22
23	-	23	-	23	-	23	-	23
24	125	24	-	24	-	24	-	24
25	250	25	-	25	-	25	-	25
26	-	26	-	26	-	26	-	26
27	-	27	-	27	-	27	-	27
28	-	28	-	28	-	28	-	28
29	-	29	-	29	-	29	-	29
30	-	30	-	30	-	30	-	30
31	-	31	-	31	-	31	-	31
32	-	32	-	32	-	32	-	32
33	-	33	-	33	-	33	-	33

2,5
Fig. 2 - Distribution de la fraction hexanique.
(chromatographie sur colonne)



5,0
2,5
Fig. 3 - Distribution de la fraction étherée.
(chromatographie sur colonne)

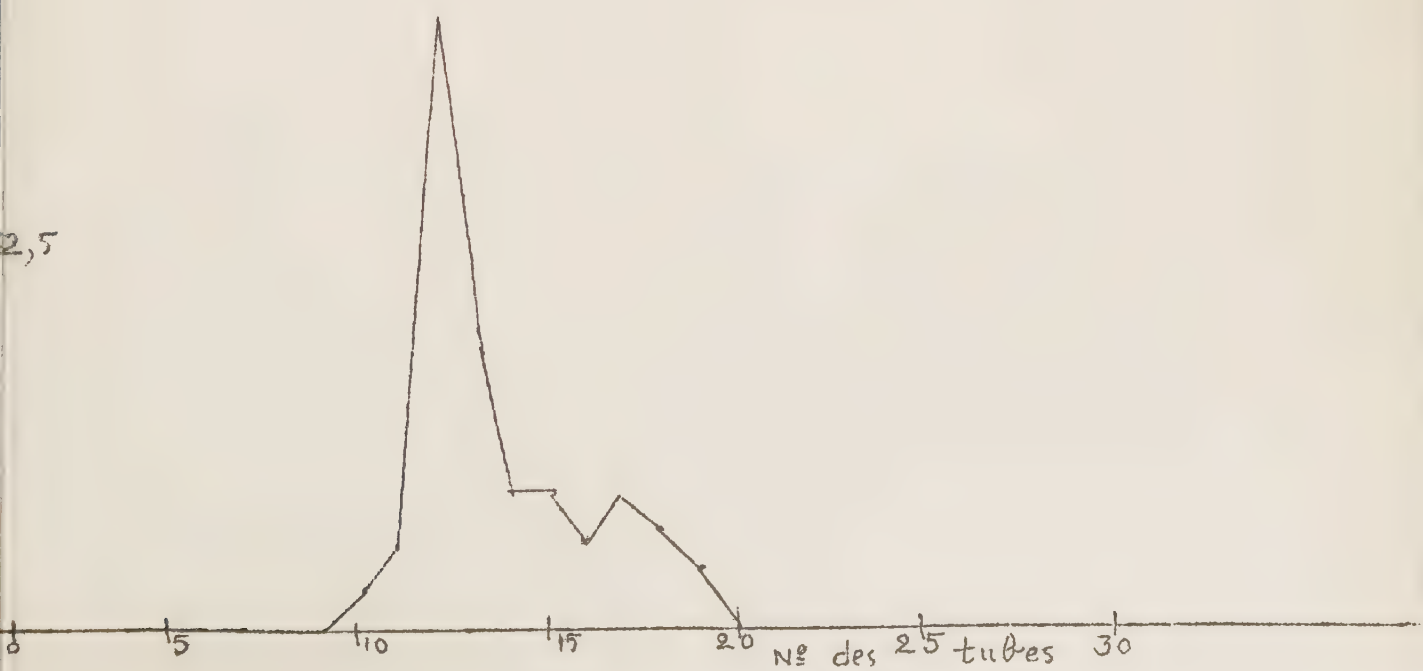


Fig. 4 - Distribution de la fraction benzénique.
(chromatographie sur colonne)

10,0

7,5

5,0

2,5

0

5

10

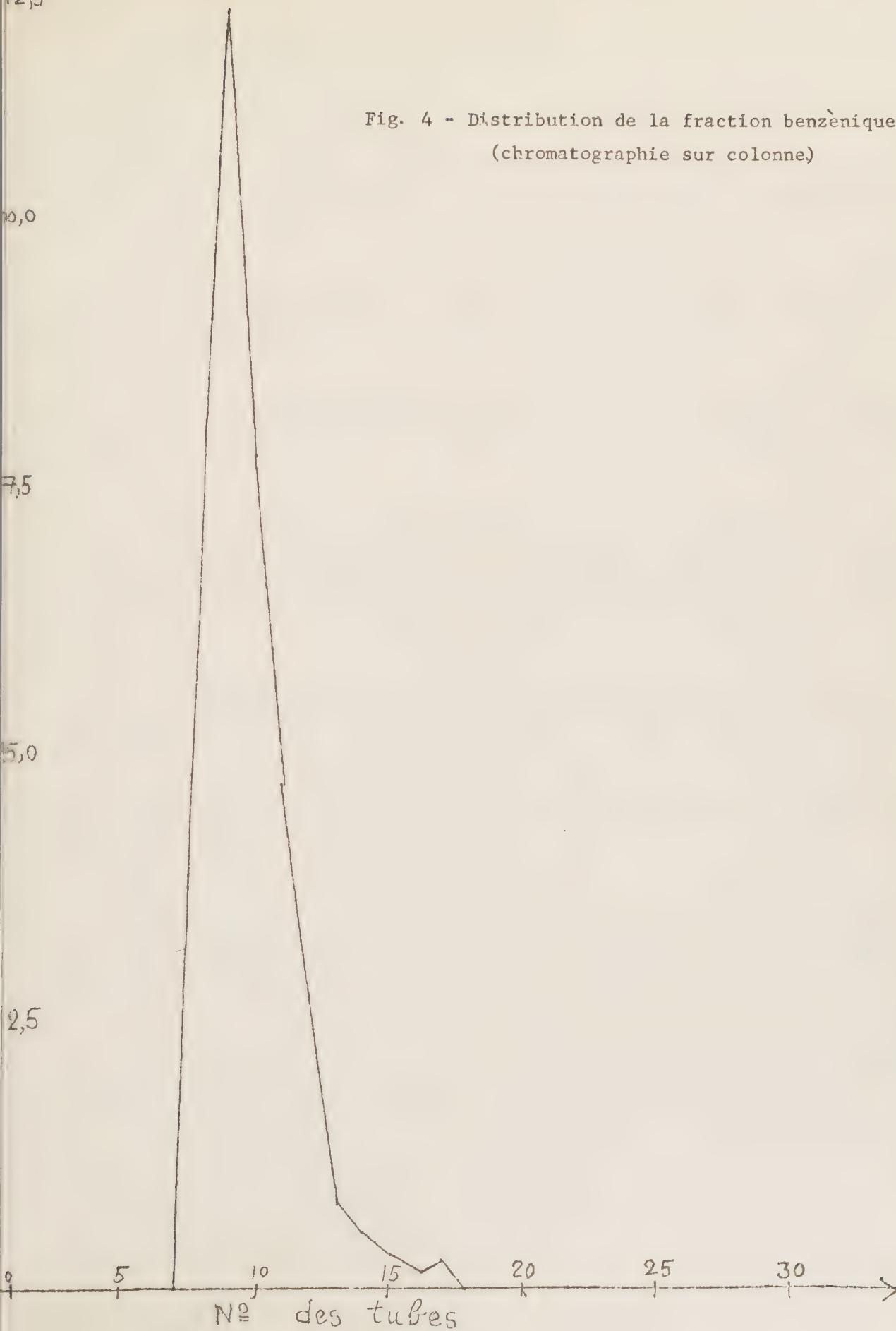
15

20

25

30

N° des tubes



.../...

Elle représente les 73,7 % du produit brut de la charge de la colonne.

Les tubes 1 à 7 (100cc de solvant) ne contenaient pas de produit même à l'état de traces (50γ). Le produit apparaît brusquement au 8ème tube (8 mg), l'élution atteint son maximum au 9ème (12 mg) et puis commence à décroître progressivement. Enfin elle cesse au 18ème tube.

La troisième fraction qui passe dans l'éther apparaît au 10ème tube et disparaît au 18ème avec un pic au 12ème.

Les pics de ces deux fractions sont stables ainsi que les quantités entraînées par les solvants. De plus dans la série des tubes, les pics sont nettement isolés.

A la suite de ces premiers résultats nous avons accru la charge de la colonne afin de permettre la séparation de quantités suffisantes pour les essais biologiques et l'étude des propriétés physiques et chimiques des fractions isolées.

En employant 500 mg au lieu de 50mg nous avons obtenu des résultats comparables.

Quelques travaux d'identification sur les deux fractions séparées par la chromatographie sur colonne.

Avant de commencer nos essais sur les insectes nous avons cherché à trouver quelques caractéristiques différenciant les fractions isolées du produit initial.

Aucune de ces fractions n'a pas été obtenue à l'état cristallisé, de même leur point de fusion s'est révélé mal défini.

.../...

.../...

a) - Teneur en chlore

En utilisant la méthode de Stépanov modifiée, nous avons trouvé les teneurs en chlore suivantes :

TABEAU VIII

<u>PRODUIT</u>	<u>TENEUR EN CHLORE (en %)</u>
Polychlorocamphane	64,4 $\pm$ 0,2
Fraction benzenique	66,8 $\pm$ 0,2
Fraction éthérée	62,0 $\pm$ 0,2

De ces résultats on peut conclure que les deux fractions sont différentes entre elles et du produit initial en ce qui concerne le degré de chloruration.

D'autre part, nous avons utilisé diverses techniques physiques d'investigation afin de parvenir à différencier ces produits de fractionnement.

a) - Spectrographie dans l'U.V. et le visible.

Aucune des fractions séparées ne présente de pics caractéristiques dans un domaine de longueur d'onde allant de 800 à 200 m μ .

b) - Spectrophotométrie dans l'Infrarouge.

Parmi les méthodes d'identification des substances organiques, l'étude du spectre d'adsorption dans l'infrarouge permet d'identifier certains groupes fonctionnels.

.../...

.../...

La présence de ces groupes détermine l'apparition de pics bien marqués dans un domaine de fréquence qui est parfois caractéristique de ces groupes.

Gunther, Kenyon et Carfer (13,26) ont signalé l'intérêt que présente cette méthode dans l'étude des insecticides.

Dans notre cas particulier nous avons utilisé un spectrophotomètre Beckman du type IR 7 ; les corps à identifier étaient incorporés dans une pastille de KBr, à la concentration de 3 %.

Les résultats obtenus figurent dans le graphique 5.

L'examen de ces graphiques ne permet pas de mettre en évidence de pics particuliers à l'une ou l'autre des fractions isolées.

Ces fractions contiennent donc des composés de structure voisine.

En comparant les spectres ainsi obtenus à ceux publiés dans la littérature pour divers insecticides chlorés (30) nous avons pu constater que les principaux pics présents dans nos trois spectres se retrouvaient également chez les composés suivants :

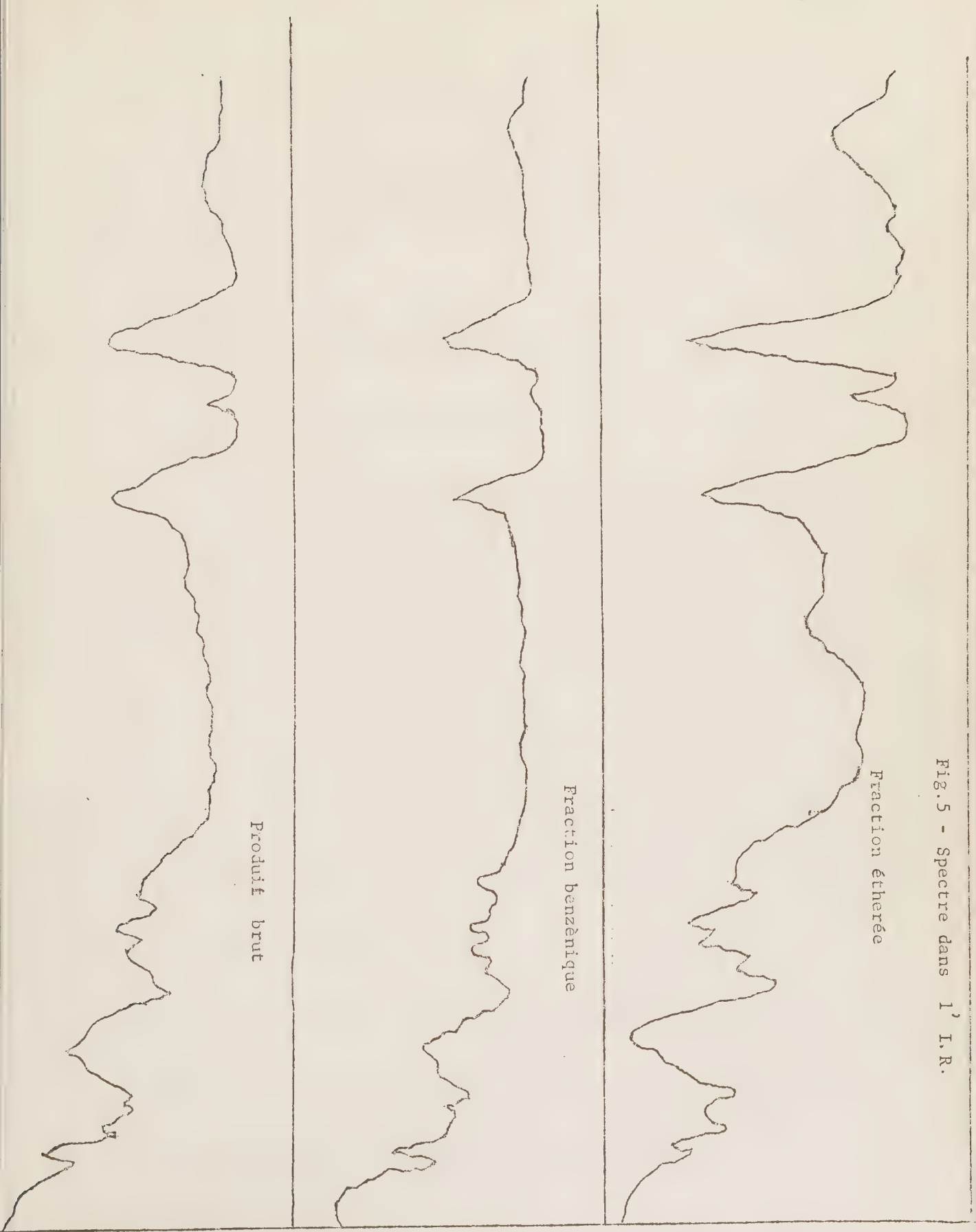
Aldrine
Dieldrine
Endrine
Isodrine

Par contre le D.D.T. et le D.D.D. ne présentent pas le pic correspondant à la fréquence à 1300 cm^{-1} .

Les pics situés vers les fréquences 720-770 et 1.450 qui seraient caractéristiques des groupements -C Cl_2 ou -C Cl_3 sont constamment présents dans les fractions étudiées.

.../...

Fig.5 - Spectre dans l'I.R.



.../..

c) - Chromatographie en phase gazeuse.

Coulson, Cavanagh et autres (17,23) ont obtenu de très bons résultats dans la séparation d'un mélange de chlordane, de dieldrin et d'autres insecticides chlorés. Cette méthode permettait simultanément l'identification et le dosage de ces substances.

Ces résultats nous ont encouragé à utiliser cette technique pour tenter de différencier les fractions isolées à partir du P.C.C.

Nous avons opéré dans les conditions suivantes :

La colonne était en pyrex, 1/8 de pouce de diamètre et 5 pieds de longueur. La phase stationnaire était constituée de 5 % silicone DOW II adsorbée sur chromosorb W 60/30 mesh et la phase mobile l'azote avec un débit de 50cc par minute. La quantité injectée était d'1 μ l d'une solution dans l'hexane (20 γ par cc). L'appareil était du type "Pestilyzer" de la maison Aérogaph muni d'un détecteur à capture d'électrons. La température de la colonne était 180° C.

Les résultats figurent dans le graphique 6.

Le Polychlorocamphane et les deux fractions isolées ont donné des chromatogrammes assez semblables ; cependant quelques différences mineures apparaissent dans la hauteur des différents pics. La présence de nombreux pics incomplètement séparés, confirme à nouveau la nature complexe de ces fractions.

d) - Pouvoir rotatoire.

Nous avons opéré dans les conditions expérimentales suivantes :

Concentration du produit (C) = 10 gr de produit dans 100cc d'hexane.

Longueur d'onde (λ) = 589 m μ .

.../...

Fig. 6 - Chromatographie à phase gazeuse.



Produit brut



Fraction étherée



Fraction benzénique

Longueur du tube polarimétrique (l) = 1 décimètre.

Les résultats sont groupés dans le tableau suivant.

TABLÉAU IX

Produit	Rotation lue	Pouvoir rotatoire
	(a)	$\left[a \right]_{\lambda} = \frac{(a)}{l.C}$
rocamphane	0,60°	+ 6,0°
benzénique	0,62°	+ 6,2°
éthérée	0,60°	+ 6,0°

Les différences observées restent donc dans le circuit des erreurs expérimentales.

D - CONCLUSIONS

Bien que les résultats obtenus en spectrophotométrie et en chromatographie en phase gazeuse soient d'une interprétation difficile, la netteté des séparations observées au cours de la chromatographie sur colonne d'une part et la teneur en chlore particulière de chacune des fractions obtenues d'autre part permettent cependant de considérer ces fractions comme différentes entre elles et différentes du produit initial.

L'insecticide connu sous le nom de Polychlorocamphane est donc un produit complexe, constitué de polychlorocamphanes dont le degré de chloruration semble variable, avec vraisemblablement prédominance des heptachlorocamphanes.

.../...

Tous les constituants présentent probablement un reste $-C Cl_3$ ou $-C Cl_2$ dans leur molécule, ce qui semble confirmer d'une part le caractère positif de la réaction de Fujiwara et d'autre part l'existence de bandes d'absorption caractéristique dans l'Infrarouge.

Enfin la séparation assez sommaire mais cependant nette que nous avons obtenue doit nous permettre de préciser si l'activité insecticide varie selon la composition des mélanges chlorés qui constituent les fractions obtenues.

C'est l'objet de la seconde partie du travail.

PARTIE II

=====

ETUDE COMPARATIVE DU POUVOIR INSECTICIDE DU POLYCHLOROCAMPHANE ET DE DEUX PRODUITS DE FRACTIONNEMENT.

Après avoir isolé par la méthode de chromatographie sur colonne les deux fractions (fraction benzénique et fraction étherée), nous avons cherché à déterminer leur toxicité par rapport à celle du produit brut.

Ces essais furent effectués sur les insectes suivants :

Ceratitis capitata, adulte

Drosophila melanogaster, adulte

Leptinotarsa decemlineata, adulte

Meligethes aeneus, adulte

Brevicoryne brassicae, aptère

Cirphis (Pseudaletia) unipuncta, chenille

Nous avons choisi les insectes appartenant à des familles et des ordres différents afin d'étudier si la toxicité de l'insecticide n'était pas modifiée pour les différences morphologiques et fonctionnelles qui existent entre ces différents types d'insectes.

A - CONDITIONS EXPERIMENTALES.

I - LES INSECTES UTILISES.

La toxicité d'un insecticide varie selon l'âge, le sexe, la souche et l'état physiologique de l'insecte (13). On a donc intérêt à travailler avec des insectes dont l'âge et les conditions de vie sont semblables.

.../...

.../...

Cette possibilité est donnée lorsque l'élevage de ces insectes est réalisé en laboratoire. Les facteurs biotiques et abiotiques peuvent alors dans une certaine mesure être contrôlés.

Ainsi, par exemple, l'utilisation de la nutrition artificielle aussi bien que des substrats artificiels pour la ponte, permettent au chercheurs de régler le cycle biologique des insectes selon les besoins de l'expérience.

Dans notre cas particulier, les Ceratites, les Drosophiles et les Cirphis ont pu être obtenus à partir de tels élevages. En ce qui concerne les Doryphores, et les Meligèthes, nous avons simplement utilisé des insectes provenant d'un même biotype.

a) - Ceratites et Drosophiles.

Ces insectes sont très fréquemment utilisés dans les essais biologiques par suite de la facilité de leur élevage.

Dans nos expérimentations nous avons employé des lots provenant d'une seule cage ; il s'agissait donc d'une seule souche d'individus du même âge ayant vécu dans les mêmes conditions.

L'âge favorable pour les essais, fut choisi après consultation des chercheurs du Laboratoire de Phytopharmacie de Versailles.

C'est ainsi que les Ceratites utilisées étaient âgées de dix jours et les Drosophiles de un jour seulement.

D'autre part les deux sexes présentant une différence de poids et de sensibilité aux substances toxiques, nous avons toujours employé des insectes mâles dans nos essais.

.../...

.../...

b) - Doryphores.

Ils sont élevés en plein air sur une culture de pommes de terre limitée par une cage. Les conditions bioclimatiques étaient donc semblables pour un même lot de Doryphores.

Nous avons collecté les adultes une semaine après leur exuviation imaginale.

c) - Meligèthes.

Les Meligèthes furent prélevées dans un champ de colza du Centre de Versailles (I.N.R.A.). La collecte fut faite dès leur apparition dans le champ ; nous avons pris soin de capturer les insectes le même jour, sur des plantes voisines (10 mètres carrés).

d) - Chenilles de Cirphis.

Les chenilles des Lépidoptères sont faciles à élever au laboratoire. Le choix des conditions extérieures permet de modifier leur cycle biologique ce qui facilite les expérimentations.

Nous nous sommes servis des chenilles de Cirphis unipuncta que le laboratoire de la Minière pouvait nous procurer.

Les chenilles provenaient de la même souche et elles étaient du 4ème stade ; elles étaient assez grandes mais encore sensibles à l'action de l'insecticide.

..../...

.... / ...

e) - Les Aphides.

M. BONNEMAISON a eu l'amabilité de nous procurer un lot de Brevicoryne brassicae aptères, âgés de sept jours et élevés dans son laboratoire.

II - LES METHODES D'INTOXICATION EMPLOYEES.

Le choix de la méthode varie avec le type d'insecte utilisé. Ainsi pour les Diptères et les Coléoptères nous avons utilisé le film toxique sur verre, pour les Chenilles de Cirphis l'immersion dans des suspensions aqueuses et pour les Aphides une méthode d'intoxication par voie orale.

Les qualités fondamentales de ces méthodes peuvent être ainsi définies. :

a) - La contamination de l'insecte par le poison doit être aussi uniforme que possible. Le dispositif expérimental doit obliger l'insecte à venir en contact avec la substance toxique.

b) - Les différents facteurs abiotiques (température, humidité etc..) qui influencent la toxicité doivent être maintenus constants.

Ceci posé, nous entrons dans la description des méthodes utilisées.

a) - Film toxique sur verre.

Cette méthode est la plus couramment utilisée dans les essais biologiques, soit pour la détermination de la toxicité d'un insecticide, soit pour la détermination de certains résidus dans les plantes, le lait et les fruits (1,39,40). Le film toxique est formé par le dépôt d'un insecticide sur une surface après évaporation du solvant dans lequel il était dissout.

... / ...

Comme surfaces on utilise soit les parois horizontales d'une boîte de Petri (77), soit les parois verticales d'un flacon cylindrique (11) ou cône (erlenmeyer par exemple) (52).

L'introduction de l'insecticide est faite au moyen d'une pipette ou d'un petit pulvérisateur-"atomiseur" (12). Lorsqu'on utilise ce dernier moyen le film est plus uniforme ; cependant son emploi est limité à la réalisation de films toxiques dans les récipients fermés de grande taille : bocaux, flacons coniques. Lorsqu'on se sert de boîtes de Petri on évite d'utilisation de ces pulvérisateurs car le nuage de gouttelettes peut être dispersé en dehors des surfaces à traiter et en conséquence le dépôt peut varier d'un essai à l'autre.

L'insecticide est dissous dans un solvant organique tel que l'éther, la kérosène, l'hexane, l'acétone etc.. selon l'insecticide utilisé. L'éther est le plus souvent employé à cause de son évaporation rapide. Le benzène est exclu car ses vapeurs sont elles-mêmes toxiques. (13)

On peut traiter les deux parois d'une boîte de Pétri afin d'augmenter l'efficacité de la méthode d'une part, et d'éviter les problèmes posés par les insectes qui séjournent de préférence sur l'une ou l'autre face de la boîte.

L'emploi d'une tour de pulvérisation ne semble pas nécessaire dans le cas présent ; la reproductibilité des résultats obtenus par la méthode précédente, qui a le mérite de la simplicité opératoire, étant largement suffisante pour nos expérimentations.

Les insectes le plus souvent utilisés dans ce type d'essai sont les diptères.

Ces insectes peuvent se tenir et marcher sur des surfaces lisses grâce au pulvillus et à l'arolium dont leurs pattes sont pourvues, et grâce aussi au mécanisme qui permet le retrait des griffes qui deviendraient un obstacle dans ces conditions tout à fait particulières.

.../...

Le pulvillus et l'arolium ont une cuticule extrêmement fine ; la pénétration d'un insecticide y est donc plus facile qu'aux parties du corps à cuticule épaisse.

L'ingestion par voie orale est possible car les Diptères sont du type lècheur-suceur.

Ceci peut être important dans le cas des Ceratites qui séjournèrent 24 heures sur le film toxique. D'autre part il n'est pas exclu que ce toxique puisse stimuler l'alimentation par voie réflexe.

Nous avons effectivement pu observer une extension de la trompe, qui est peut être en relation avec une prise de nourriture, durant les 24 heures de contact de la ceratite avec l'insecticide.

Les Coléoptères peuvent être également utilisés dans cette sorte d'essai mais la concentration en insecticides du film toxique devra être plus élevée.

C'est ce qui apparaît dans le tableau suivant où figurent les DL50 du Polychlorocamphane obtenues sur deux diptères et deux coléoptères.

	DUREE DE CONTACT	POIDS DE L'INSECTE	DL 50 (γ / ml)	DL50 par mg d'Insecte
3				
2	24 heures	8,60 mg	32 γ / ml	4 γ /ml
1	4 -	0,84 mg	10 γ / ml	12 γ /ml
4	72 -	143,60 mg	2.070 γ / ml	14 γ /ml
5	5 -	1,30 mg	34 γ / ml	27 γ /ml

..../...



.../...

Protocole expérimentale.

Nous avons employé les boîtes de Petri d'un diamètre de 10 cm. L'introduction de l'insecticide dans la boîte était faite à l'aide d'une pipette, à raison de 1 cm³ de solution étherée sur chaque paroi.

Nous agitons ensuite la boîte afin de répandre l'insecticide sur toute la surface avant que l'éther ne soit évaporé.

Après 30 minutes, nous introduisons les insectes dans les boîtes.

Le temps de contact varie selon l'insecte et dépend de deux facteurs :

a) - Le temps d'apparition de la mortalité naturelle.

b) - La rapidité d'action de l'insecticide.

Ce temps varie de 4 heures à quelques jours soit :

Drosophiles	:	4 heures
Méligèthes	:	5 heures
Ceratites	:	24 heures
Doryphores	:	72 heures

Pendant le temps du contact, les boîtes sont mises dans une étuve à température (22°C) et humidité (25 %) constantes.

Ce degré d'humidité, assez faible, ne correspond d'ailleurs pas exactement à celui de l'atmosphère des boîtes de Petri elles-mêmes, qui est sensiblement plus élevé.

.../... ,

b) - Trempage dans des suspensions aqueuses.

Nous avons voulu appliquer la méthode précédente sur les chenilles de Cirphis unipuncta.

Les pseudopodes abdominaux et anaux présentent des surfaces favorables pour la pénétration de l'insecticide. Mais la chenille en régurgitant répand le liquide intestinal autour d'elle, "masquant" ainsi le film toxique.

On fut donc amené à utiliser une méthode différente, celle du trempage. Celle-ci fut au commencement utilisée pour les larves de moustiques (54) et pour certains animaux aquatiques.

Mais les insectes terrestres peuvent aussi vivre de quelques heures à quelques jours dans le milieu aquatique grâce au métabolisme anaérobie.

On peut donc utiliser des suspensions aqueuses pour les insectes terrestres à condition que la durée de trempage ne dure pas longtemps. Dans le cas des essais biologiques quelques secondes à quelques minutes suffisent pour que l'insecticide additionné d'un agent tensioactif convenable, vienne en contact avec l'insecte.

Cette méthode présente le grand avantage de permettre le mouillage uniforme de toute la surface extérieure du corps de l'insecte. Cependant elle n'est pas couramment utilisée car elle est plus complexe que la méthode précédente.

Il existe évidemment une possibilité d'intoxication par voie orale puisque la chenille est capable de boire.

Le protocole expérimental est le suivant :

a) - Mélange au mortier d'une quantité déterminée de P.C.C et d'un agent tensio-actif permettant la mise en suspension aqueuse de l'insecticide et le "mouillage" de l'insecte.

.../...

b) - Addition progressive de l'eau et dilution aux concentrations désirées.

c) - Introduction des chenilles; la durée de trempage est de cinq minutes.

d) - Après leur séchage à l'air, les insectes sont introduits dans de petites boîtes contenant de la sciure humide et de la nourriture (feuilles de maïs).

e) - Le contrôle de la mortalité est fait après 24 heures de séjour dans une étuve à 22°C.

f) - L'alimentation des chenilles de Cirphis est indispensable car un jeûne de quelques heures provoque le cannibalisme.

c) - Intoxication par voie orale.

Le film toxique sur verre n'est pas applicable dans le cas des Pucerons. Ces insectes sont dépourvus d'arolium et de pulvillus ; en conséquence, le contact avec le film toxique est très insuffisant. De plus leurs pièces buccales sont du type piqueur-suceur ; ils ne prennent leur nourriture qu'à l'intérieur de la plante et la toxicité d'ingestion ne peut intervenir.

Au Laboratoire de Phytopharmacie de Versailles on utilise dans le cas des Aphides et des Acariens la pulvérisation de la plante-hôte (I6).

Cette pulvérisation est assurée par un appareil composé d'un plateau tournant sur lequel sont disposés les plantes à pulvériser (non infestées) ; ce plateau est surmonté d'un cylindre vertical limitant le nuage d'insecticide qui est émis à partir d'un pulvérisateur de verre situé à la partie supérieure de l'appareil.

.../...

.../...

La quantité d'insecticide déposée sur la plante est calculée par rapport à la quantité déposée sur un papier filtre de surface connue et ayant subi la pulvérisation dans les mêmes conditions. La pression de pulvérisation reste constante pendant l'opération.

Après le traitement des feuilles de choux nous en avons découpé des rondelles de 2 cm de diamètre que nous disposons à la base de petits anneaux de verre dont le diamètre intérieur est exactement de 2 cm. Ces anneaux étaient posés sur une plaque de verre à laquelle ils étaient attachés. Leurs parois étaient poudrées de talc pour empêcher la fuite des Aphides.

Le contrôle de mortalité avait lieu 24 heures plus tard. Pendant le temps de contact, les anneaux étaient posés dans une étuve à 22°C.

Le dessèchement partiel de feuilles qu'on observe à la fin de l'essai ne semble pas gêner l'évaluation de la toxicité.

3 - NOMBRE D'INSECTES UTILISES.

Dans le cas de tous les insectes à tester sauf la Cirphis nous avons utilisé pour chaque série d'essais, comportant l'examen de trois produits : produit brut, fraction benzénique, fraction éthérée, 30 lots de 20 insectes tirés du même milieu (même cage, même souche pour les insectes élevés en laboratoire, même champ pour les sujets prélevés à l'extérieur).

Ces 30 lots sont répartis de la manière suivante :

a) - 3 lots servant de témoins (3 répétitions)

b) - 9 lots pour chaque produit à étudier, soit 3 lots pour la dose forte, 3 pour la dose moyenne et 3 pour la dose faible. Les 3 lots de chaque dose sont répartis en 3 répétitions.

Comme il y avait trois produits à tester en même temps (produit brut,

.../...

fraction benzénique, fraction étherée) chaque série comprenait 27 lots de 20 insectes, plus les 3 lots témoins, soit 600 insectes. Chaque série expérimentale était réalisée la même demi-journée, les conditions extérieures étant ainsi aussi semblables que possible.

Nous avons procédé à trois expérimentations successives de ce type.

Le nombre total des individus utilisés dans les 3 séries s'élève ainsi à 1.800.

Pour les Cirphis la répartition n'est pas tout à fait conforme à ce schéma.

Pour chaque dose, le nombre de répétition a été porté à cinq, mais chaque répétition ne contenait que 8 chenilles, au lieu des 20 insectes employés dans les autres cas.

Ainsi ; le nombre d'insectes par dose était de quarante et le nombre total des chenilles, par série de quatre cents.

Les doses indiquées dans les tableaux I,II,III,IV orrespondent à la quantité de l'insecticide contenue dans 1cc de la solution utilisée pour le film toxique.

Dans notre cas particulier, 1cc de solution est déposée sur chaque paroi de la boîte de Pétri.

Lorsque nous avons utilisé la technique du trempage (Chenilles de Cirphis), les doses représentent la concentration de la suspension aqueuse utilisée (tableau V).

La DL 50 dans notre cas particulier représente la dose de toxique offerte à un lot d'insectes dans les conditions expérimentales déjà décrites et qui est capable de provoquer la mort de 50 % de ces insectes. Elle est exprimée en concentration comme les différentes doses utilisées dans nos expériences.

B - LES RESULTATS.

Les résultats obtenus figurent dans les tableaux et les graphiques suivants (Tableaux I,II,III,IV,V et graphiques I,2,3,4,5).

Nous avons dû abandonner les essais sur les Aphides par suite de la toxicité très faible du P.C.C. Le D.D.T et le Lindane, employés dans les mêmes conditions ont provoqué une mortalité de 100% à la concentration de 2.10^{-3} tandis que le Polychlorocamphane à une concentration 50 fois plus forte (1.10^{-1}) est pratiquement sans action.

TABLEAU IRésultats des essais sur Doryphore.

<u>DOSES</u>	<u>MORTALITE EN %</u>			<u>DL 50</u>
	<u>1ère Série</u>	<u>2ème Série</u>	<u>3ème Série</u>	<u>+ écart-type</u>
2 (1.000) γ / ml:	17,3	18,6	16,7	2 (2.072)
2 (2.000) γ / ml:	41,4	44,0	53,3	$\pm$ 2 (95)
2 (4.000) γ / ml:	79,3	86,5	78,3	
2 (1.000) γ / ml:	31,0	30,5	35,0	2 (1.401)
2 (2.000) γ / ml:	65,6	72,8	70,0	$\pm$ 2 (73)
2 (4.000) γ / ml:	91,4	91,6	88,3	
2 (1.000) γ / ml:	13,9	15,3	13,3	2 (3.500)
2 (2.000) γ / ml:	27,6	25,4	30,0	$\pm$ 2 (31)
2 (4.000) γ / ml:	60,4	54,2	51,7	

.../...

TOXICITE RELATIVE.

$$\frac{\text{DL50 de Fr. Benzénique}}{\text{DL50 de F.C.C.}} = 1,48$$

Les courbes du P.C.C. et de la Fraction éthérée ne sont pas comparables car elles ne sont pas parallèles.

TABEAU II

RESULTATS DES ESSAIS SUR MELICETHE.

	<u>DOSES</u>	<u>MORTALITE EN %</u>			<u>DL 50</u>
		<u>1ère Série</u>	<u>2ème Série</u>	<u>3ème Série</u>	<u>± écart-type</u>
	2 (15) γ / ml	15,0	12,5	16,9	2 (34,9)
	2 (30) γ / ml	40,0	44,0	46,7	± 2 (1,7)
	2 (60) γ / ml	74,5	78,3	71,2	
	2 (12,5) γ / ml	25,0	30,5	27,9	2 (20,8)
	2 (25) γ / ml	52,5	55,9	56,9	± 2 (1,0)
	2 (50) γ / ml	86,4	86,7	91,5	
	2 (25) γ / ml	10,5	8,3	16,1	2 (63,3)
	2 (50) γ / ml	43,1	45,0	36,7	± 2 (3,2)
	2 (100) γ / ml	69,5	61,4	77,2	

TOXICITE RELATIVE

$$\frac{\text{DL50 de Fr. Benzenique}}{\text{DL50 de P.C.C.}} = 1,67$$

DL50 de P.C.C

$$\frac{\text{DL50 de Fr. Ethérée}}{\text{DL50 de P.C.C.}} = 0,55$$

DL50 de P.C.C

..../....

TABIEAU III

RESULTATS DES ESSAIS SUR DROSOPHILE

<u>DOSES</u>		<u>MORTALITE EN %</u>			<u>DL 50</u>
		<u>1ère Série</u>	<u>2ème Série</u>	<u>3ème Série</u>	<u>± écart-type</u>
2 (5)	γ / ml	18,3	20,3	20,3	2 (10,0)
2 (10)	γ / ml	49,2	56,0	47,4	± 2 (0,5)
2 (20)	γ / ml	81,7	75,5	81,0	
2 (5)	γ / ml	27,6	35,0	33,9	2 (7,4)
2 (10)	γ / ml	65,0	62,7	63,5	± 2 (0,4)
2 (20)	γ / ml	89,4	87,7	84,7	
2 (5)	γ / ml	21,7	20,7	19,7	2 (10,9)
2 (10)	γ / ml	47,5	44,0	53,4	± 2 (0,6)
2 (20)	γ / ml	73,2	71,2	71,7	

TOXICITE RELATIVE

$$\frac{\text{DL50 de Fr. Benzénique}}{\text{DL50 de P.C.C.}} = 1,35$$

$$\frac{\text{DL50 de Fr. Ethérée}}{\text{DL50 de P.C.C.}} = 0,92$$

TABLEAU IV

RESULTATS DES ESSAIS SUR CERATITE.

<u>DOSES</u>		<u>MORTALITE EN %</u>			<u>DL50</u>
		<u>1ère Série</u>	<u>2ème Série</u>	<u>3ème Série</u>	<u>+ écart-type</u>
2 (15)	γ / ml	16,9	14,0	8,5	2 (32,1)
2 (30)	γ / ml	49,2	46,0	43,1	± 2 (1,3)
2 (60)	γ / ml	86,0	83,3	80,0	
2 (10)	γ / ml	13,6	15,9	16,9	2 (21,5)
2 (20)	γ / ml	50,8	45,0	40,4	± 2 (1,0)
2 (40)	γ / ml	85,0	78,7	75,0	
2 (25)	γ / ml	12,7	25,4	20,0	2 (49,4)
2 (50)	γ / ml	44,6	57,9	52,6	± 2 (3,3)
2 (100)	γ / ml	74,2	86,9	83,3	

TOXICITE RELATIVE

DL50 de Fr.Benzénique = 1,49
DL50 de P.C.C.

DL50 de Fr.Ethérée = 0,65
DL50 de P.C.C.

TABLEAU VRESULTATS DES ESSAIS SUR CIRPHIS

<u>DOSES</u>	<u>MORTALITE EN %</u>			<u>DL50</u> <u>± écart-type</u>
	<u>1ère Série</u>	<u>2ème Série</u>	<u>3ème Série</u>	
6.10 ⁻⁴	33,3	35,1	30,8	9,78.10 ⁻⁴
12.10 ⁻⁴	55,6	48,6	59,0	± 1,08.10 ⁻⁴
24.10 ⁻⁴	80,6	83,8	82,0	
6.10 ⁻⁴	44,4	48,6	51,3	6,68.10 ⁻⁴
12.10 ⁻⁴	63,9	62,2	74,3	± 1,12.10 ⁻⁴
24.10 ⁻⁴	88,9	86,5	92,3	
6.10 ⁻⁴	16,6	16,8	17,9	18,64.10 ⁻⁴
12.10 ⁻⁴	33,3	27,0	35,9	± 1,11.10 ⁻⁴
24.10 ⁻⁴	61,1	62,2	53,8	

TOXICITE RELATIVE

DL50 de Fr.Benzenique

 DL50 de F.C.C. = 1,46

DL50 de Fr.Ethérée

 DL50 de F.C.C. = 0,52

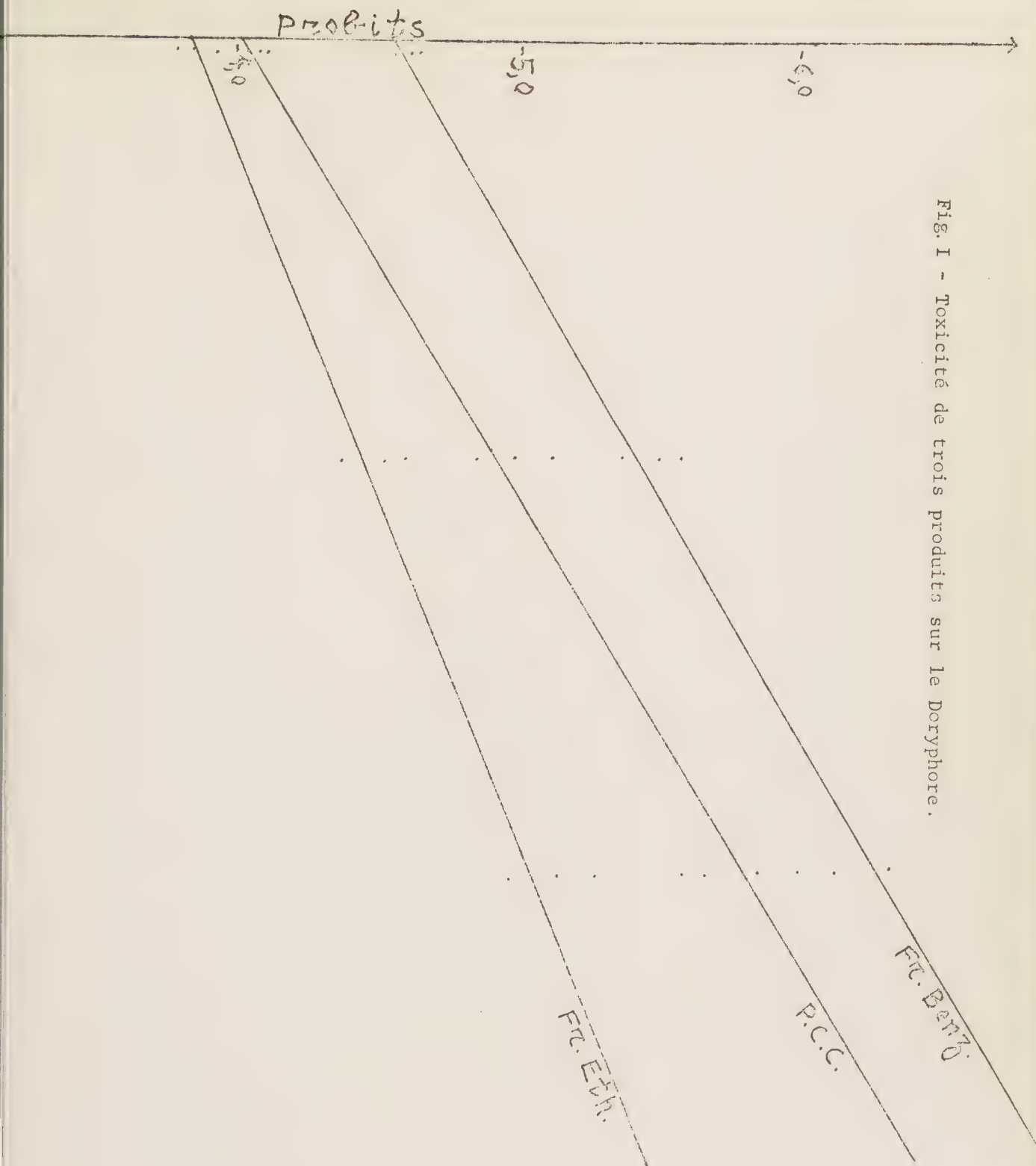
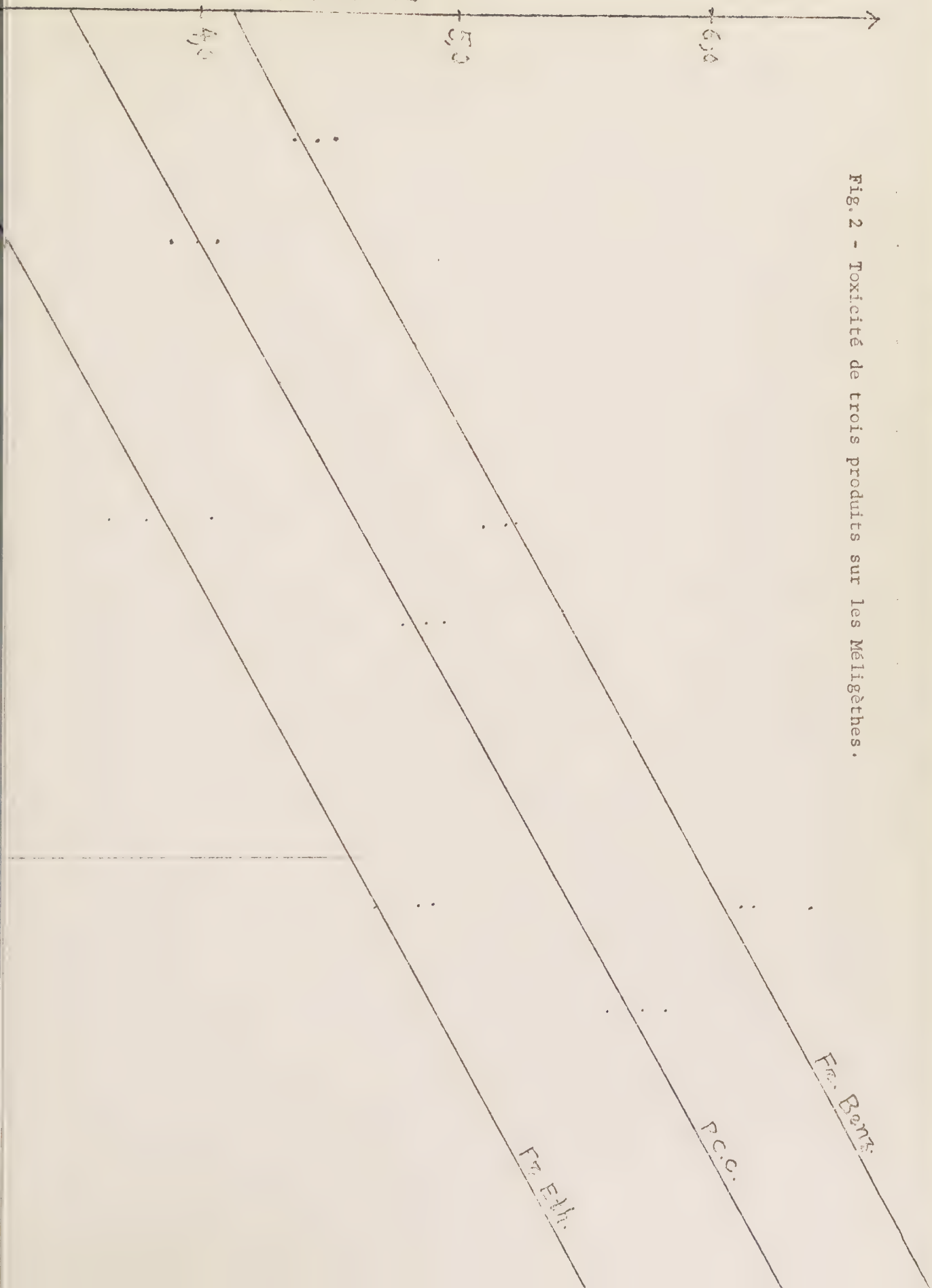


Fig. I - Toxicité de trois produits sur le Doryphore.

Probits

- 50 -

Fig. 2 - Toxicité de trois produits sur les Melligèthes.



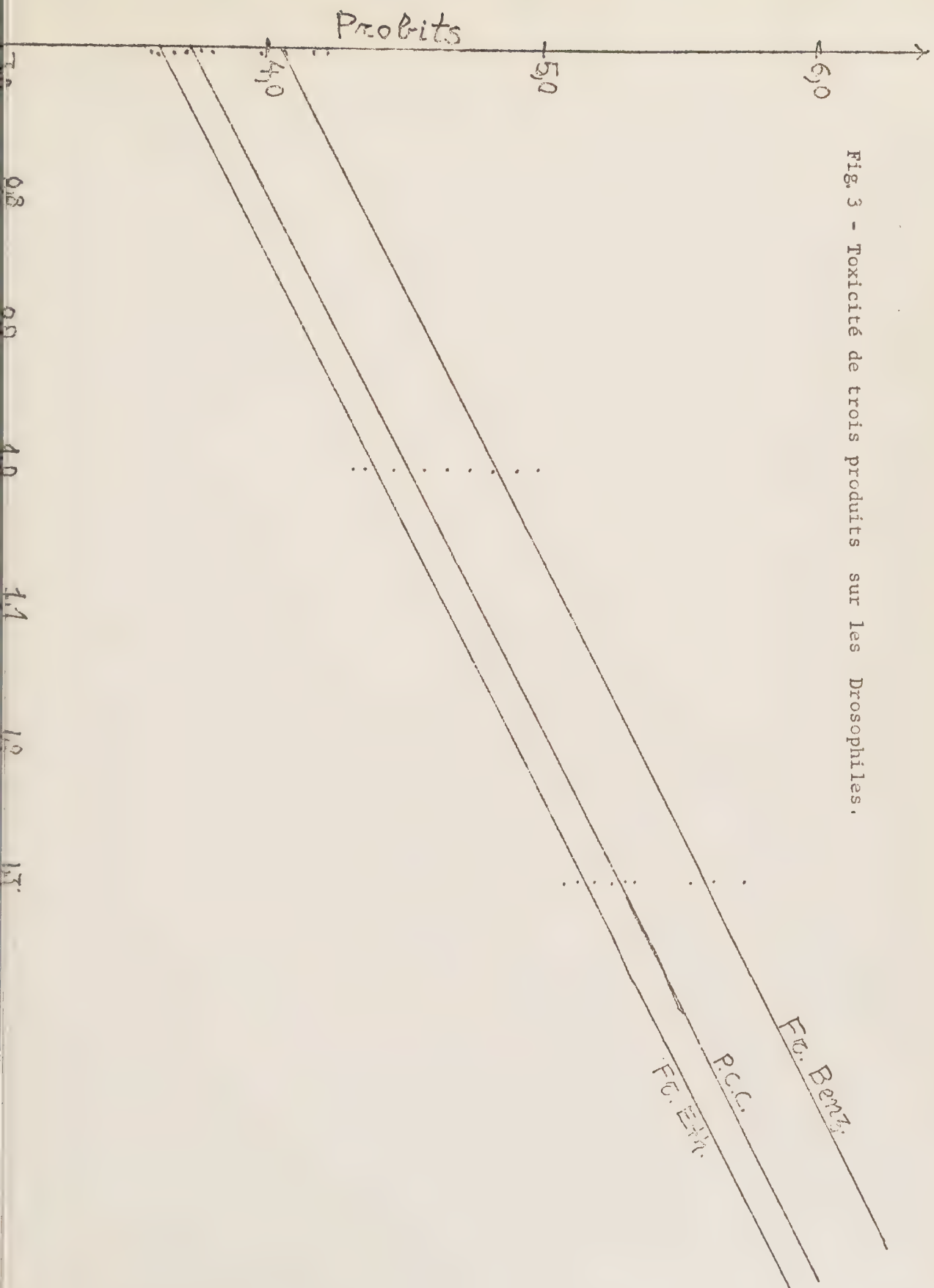
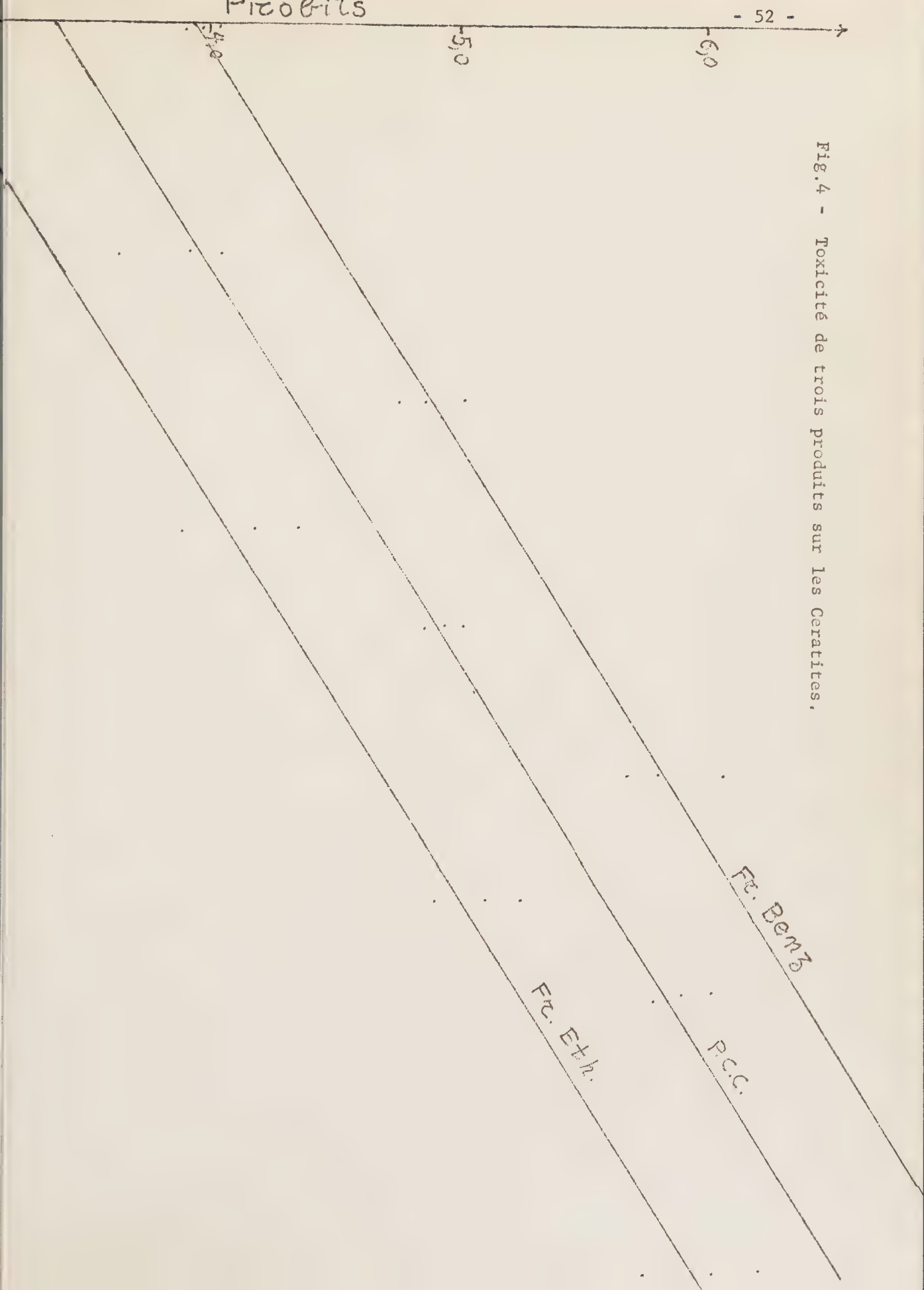


Fig. 4 - Toxicité de trois produits sur les Ceratites.



Probits

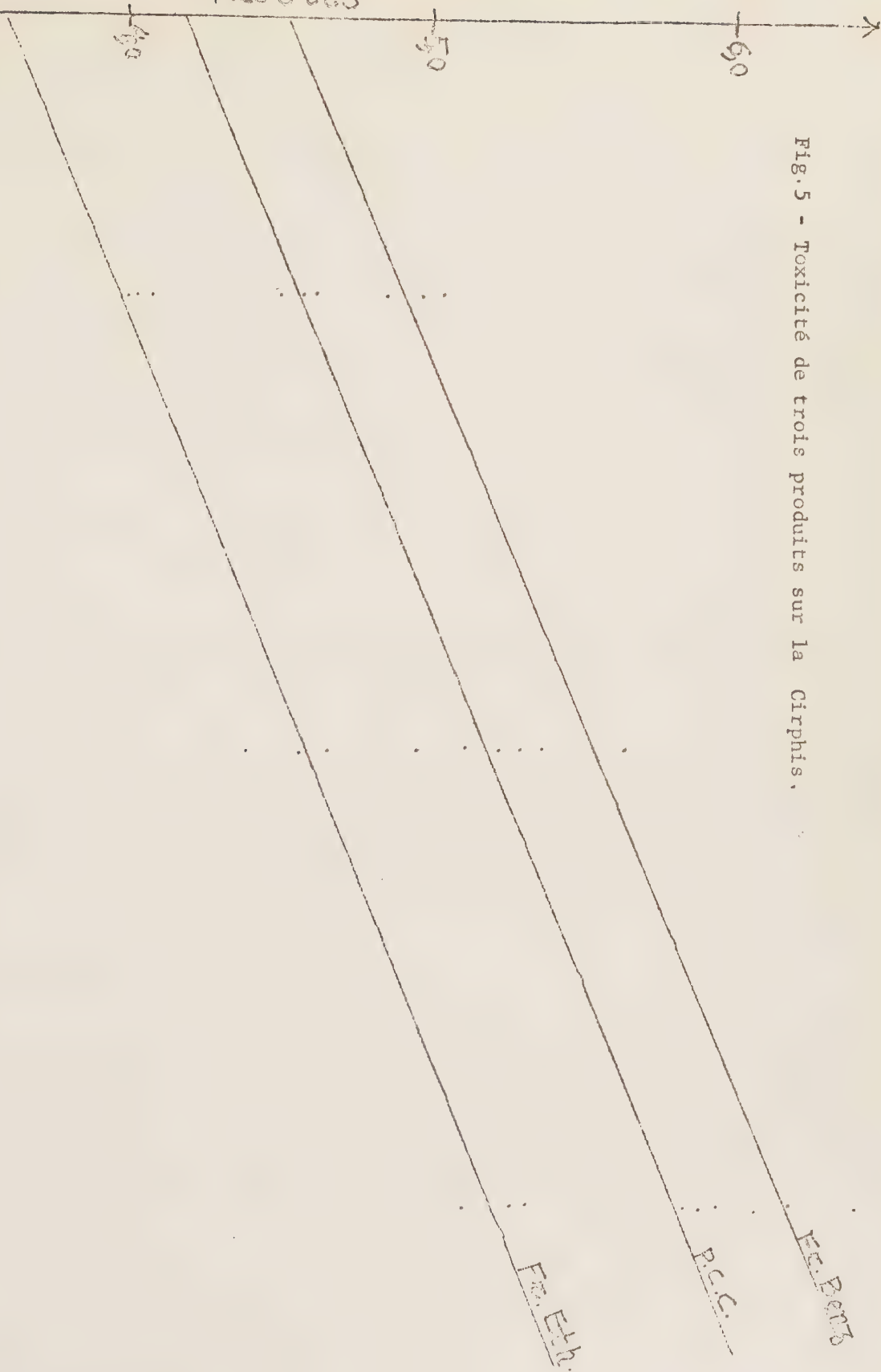


Fig. 5 - Toxicité de trois produits sur la Cirphis.

C - ANALYSE STATISTIQUEI - CORRECTION DE LA MORTALITE OBSERVEE.

Pendant un essai biologique on prend soin de ne pas avoir de morts chez les témoins. Malgré cela, il arrive assez souvent d'observer certaine mortalité naturelle. La mortalité mesurée chez les insectes traités doit être corrigée, car cette mortalité n'est pas toujours provoquée par le poison. Cette correction de la mortalité est faite d'après la formule connue sous le nom de formule d'Abbott que l'on exprime sous la forme suivante :

$$P = \frac{P - C}{100 - C}$$

où P = la mortalité corrigée, P_I = la mortalité observée, C = la mortalité naturelle.

La correction, d'après cette formule, est valable lorsqu'il s'agit des mortalités naturelles faibles ; dans le cas où celles-ci atteignent des niveaux de 10 à 20 % la correction de la mortalité observée est plus complexe. Finney (2⁴) donne un exemple de correction pour une mortalité naturelle de 16 %.

2 - TRANSFORMATION DES VARIABLES.

Les résultats d'un essai biologique sont exprimés par la mortalité observée en fonction de la dose. La dose peut être la concentration de l'insecticide dans la solution ou la suspension, ou encore le poids du produit offert à l'insecte : quantité à l'unité de surface, quantité ingérée, injectée ou déposée, peut-être même : temps de contact ou d'exposition.

Si on met les doses en abscisse et le pourcentage de la mortalité en ordonnée, on obtient une courbe en S asymétrique. Cette asymétrie s'explique par la distribution anormale de la sensibilité ; la toxicité est plutôt reliée aux logarithmes des doses qu'aux doses elles-mêmes. C'est en remplaçant les doses par leurs logarithmes qu'on arrive à avoir une distribution normale de la sensibilité.

La courbe en S devient symétrique grâce à ce changement de variable.

Mais une courbe en S, même symétrique, est peu utilisable. Pour comparer la toxicité de deux produits on doit avoir des courbes à forme moins complexe. D'où la nécessité de la transformation de ces courbes en lignes droites dont le calcul et l'utilisation sont simples.

3 - TRANSFORMATION DE LA COURBE EN LIGNE DROITE.

Plusieurs méthodes furent proposées pour la transformation du pourcentage de mortalité.

Berkston (24) utilisa les logarithmes népériens du pourcentage des morts (P) et des survivants (Q) à la place du pourcentage de mortalité.

$$Y = \ln \frac{P}{Q}$$

Une autre méthode (25) consiste à employer le sinus carré de l'angle en un point de la courbe à la place de la mortalité.

$$P = \sin^2 \varphi$$

L'avantage de cette méthode est que la variance de ϕ ne dépend pas de ces valeurs.

Mais la méthode de transformation la plus couramment utilisée dans les laboratoires de Phytopharmacie est celle des probits.

Gaddum (27) proposa une unité basée sur l'écart type de la courbe qu'il appela : équivalent de la déviation normale (N.E.D). L'inconvénient en est que la gamme de ces unités comprend des nombres positifs et négatifs. Bliss (4) surmonta cette difficulté en donnant au milieu de la gamme la valeur 5,0. Ces nouvelles unités furent appelées "probits".

A partir de ces travaux de nombreux auteurs (24) ont étudié plusieurs cas d'applications pratiques.

Les unités probits sont des valeurs remplaçant les limites de l'intégrale qui représente l'équation de Gauss :

$$P = \int_{-\infty}^{Y-5} e^{-\frac{u^2}{2}} du \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}}$$

où : P = mortalité, Y = Probits

4 - CALCUL DE LA LIGNE DE REGRESSION.

On effectue le calcul dans l'ordre suivant :

a) - On transforme les doses en logarithmes des doses (x)

b) - Calcul des probits "empiriques" à partir des mortalités corrigées et tracé graphique de ligne de regression provisoire (logarithme des doses en abscisse, probits empiriques en ordonnée).

Calcul des probits "attendus" (Y), correspondant aux différentes valeurs du logarithme des doses.

c) - Détermination des probits de travail (working probits) à partir des probits attendus (Y) et du pourcentage de la mortalité (P)*.

d) - Détermination du coefficient de pondération (w) à partir des valeurs Y. Ces coefficients permettent de tenir compte du fait que les variances dépendent des valeurs de probits.*

e) - Calcul de l'équation de regression.

Toutes les valeurs de x et y doivent être pondérées par "w" ainsi que par le nombre total d'insectes utilisés dans chaque cas (n). En tenant compte de cette pondération on a :

$$\bar{x} = \frac{S(nwx)}{S(nw)}, \quad \bar{y} = \frac{S(nwy)}{S(nw)}$$

$$S.C.E._x = S_{nw} (x - \bar{x})^2 = S_{nwx}^2 - \frac{(S_{nwx})^2}{S_{nw}}$$

$$S.C.E._y = S_{nw} (y - \bar{y})^2 = S_{nwy}^2 - \frac{(S_{nwy})^2}{S_{nw}}$$

$$S.P.E._{xy} = S_{nw} (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) = S_{nwxy} - \frac{S_{nwx} \cdot S_{nwy}}{S_{nw}}$$

L'équation de regression cherchée serait de la forme :

$$Y = a + b x$$

*

Valeurs trouvées sur des tables.

Le coefficient de regression b (la pente) est donné par la formule :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

et le coefficient a

$$a = \bar{y} - b.\bar{x}$$

Cette équation permet de tracer la droite de régression finale sur le graphique.

f) - Calcul de la DL50.

Si on donne à Y une valeur de 5,0 (valeur médiane de la gamme des unités probits), on obtient la valeur de x qui représente le logarithme de la "dose létale 50" et qui est désignée par m :

$$m = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b}, \text{ d'où la DL50}$$

g) - Calcul des variances des paramètres de l'équation de regression.

Les variances de m et b sont données par les formules :

$$V_{(m)} = \frac{1}{b^2} \left\{ \frac{1}{\sum_{i=1}^n} + \frac{(m - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right\}$$

$$V_{(b)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

h) - Test de χ^2 .

Le test de χ^2 met en évidence l'accord ou désaccord des résultats obtenus par l'expérience et de la ligne droite théoriquement tracée ; il est calculé

selon la formule suivante :

$$X^2 = \text{Snw } (y-\bar{y})^2 - \frac{(\text{Snw } (x-\bar{x}) \cdot (y-\bar{y}))^2}{\text{Snw } (x-\bar{x})^2}$$

et comparé aux valeurs données par les tables pour un nombre de degrés de liberté. Ce nombre est égal au nombre des lots utilisés, moins deux (car les paramètres à estimer sont deux : $\bar{x}$ et b).

5 - EXEMPLE NUMERIQUE

Comme exemple nous donnons l'analyse statistique d'un essai réalisé par la méthode des films toxiques. 3 doses de Polychlorocamphane (15 - 30 - 60 par ml de solution) ont été expérimentées. Chaque dose était répétée trois fois. Chaque lot comprenait environ 20 insectes. Nous avons ainsi par dose 60 insectes. La mortalité était calculée sur le total de ces trois répétitions.

Les calculs correspondant aux étapes a, b, c, et d sont présentés dans le tableau VI.

Les étapes suivantes figurent ci-après.

e) - Calcul de l'équation de regression.

$$\bar{x} = 1,4956 \quad , \quad \bar{y} = 4,9645$$

$$\text{Snw } (x-\bar{x})^2 = 12,774 \quad , \quad \text{Snw } (y-\bar{y})^2 = 155,980 \quad , \quad \text{Snw } (x-\bar{x})(y-\bar{y}) = 44,134$$

$$b = 3,455$$

$$Y = 0,2028 + 3,455 x$$

f) - Calcul de la DL50

$$m = 1,5059 \quad \text{d'où} \quad \text{DL}_{50} = 32,06$$

y = "working" probits

g) - Calcul de la variance des paramètres de l'équation de regression.

$$V_{(m)} = 0,00032967 \quad - \quad S_{(m)} = \pm 0,018$$

$$V_{(b)} = 0,07828401 \quad - \quad S_{(b)} = \pm 0,28$$

Au seuil 5 %, pour lequel la valeur de t correspondant à 7 degrés de liberté est 2,36, l'intervalle de confiance de $\underline{m}$ est :

$$\pm t \cdot S = 1,5059 \pm 0,0425$$

Les valeurs de la DL_{50} correspondant aux limites de cet intervalle sont alors :

$$32,06 \times 1,103 = 35,35$$

$$32,06 : 1,103 = 29,07$$

h) - Test de χ^2

$$\chi^2 = 3,498$$

Pour 7 degrés de liberté, on a une probabilité de 83 %, ce qui confirme la normalité de la distribution et l'accord entre les résultats obtenus par l'expérience et la droite finale obtenue par les calculs.

Pour vérifier les résultats nous avons réalisé trois fois cette expérimentation.

6 - COMPARAISON DES COURBES.

Après avoir transformé les courbes en S en lignes droites et avoir calculé leur équation on aborde le problème de la comparaison de ces lignes. Les lignes doivent être parallèles entre elles. Si elles se croisent, leur différence

.../...

dans la gamme des doses utilisées n'est pas constante, mais elle varie selon le taux de mortalité.

Ainsi un poison paraît plus toxique au-dessous de l'intersection et moins toxique au-dessus d'elle. C'est ce qui se passe quand on veut comparer deux insecticides dont les modes d'action ne sont pas similaires. Mais ce n'était pas le cas du Polychlorocamphane brut et de ses fractions. Finney donne la formule suivante pour calculer la pente commune, lorsque les pentes des lignes ne diffèrent pas significativement entre elles :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})(y - \bar{y}) + \sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})(y - \bar{y}) + \dots}{\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})^2 + \dots}$$

Les quantités $\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})^2$ et $\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})^2$ représentent les sommes des carrés des écarts à la moyenne de la variable pour chacun de deux insecticides.

$\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ et $\sum_{i=1}^n S_{nw} (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ représentent de même les sommes de produits des écarts.

En employant ce coefficient de regression on obtient pour chaque produit l'équation suivante :

$$\begin{aligned} Y_1 &= a_1 + b \cdot x_1 \\ Y_2 &= a_2 + b \cdot x_2 \\ Y_3 &= a_3 + b \cdot x_3 \end{aligned}$$

La comparaison de deux ou plusieurs poisons peut se faire à tout niveau; lorsqu'on prend : $Y_1 = Y_2 = Y_3 = 5$, les valeurs correspondantes de $\bar{x}$ sont m_1, m_2, m_3 .

La différence entre m_1, m_2 , représente le logarithme du rapport de deux DL_{50} ; son antilogarithme est désigné par ρ et est nommé par Finney "relative potency". Nous avons traduit ce terme par "toxicité relative".

.../....

.../...

D - CONCLUSIONS.

Dans les essais effectués sur les insectes de cinq espèces différentes nous avons obtenus des courbes pour lesquelles les valeurs de χ^2 correspondaient pour 7 degrés de liberté à des probabilités comprises entre 83 et 90 %. L'hypothèse que la distribution de sensibilité était normale ne fut donc pas infirmée, ce qui permet de calculer de façon valide les équations de régression.

D'autre part les droites de régression pour chaque insecte furent pratiquement parallèles sauf dans le cas de Doryphore. Dans ce cas nous n'avons pas pu faire la comparaison de la toxicité de la fraction éthérée par rapport à celle du produit brut.

Dans tous nos essais la comparaison des lignes a révélé que la fraction benzénique fut plus efficace que le produit brut et la fraction éthérée ; la fraction éthérée possède la toxicité la plus faible.

La toxicité relative de la fraction benzénique et de la fraction éthérée par rapport au produit brut figurent dans les tableaux VII et VIII.

La toxicité relative de la fraction benzénique par rapport au produit brut, varie de 1,35 à 1,67 montrant que chez les insectes utilisés, celle-ci est approximativement une fois et demie plus efficace que le produit brut.

La fraction éthérée de ce point de vue est moins constante. Chez les Drosophiles la différence entre sa toxicité et celle du produit brut est presque nulle, tandis que chez les autres insectes la toxicité relative varie entre 0,52 et 0,65.

Notons enfin que la toxicité des trois produits croît avec leur teneur en chlore total. Il semble donc établi que la teneur en chlore total soit en rapport avec la toxicité.

Des résultats obtenus, on peut donc conclure que :

.../...

TABLERAU VII

TOXICITE RELATIVE DE LA FRACTION BENZENIQUE PAR RAPPORT AU PRODUIT BRUT.

<u>INSECTES UTILISES DANS LES ESSAIS</u>	TOXICITE RELATIVE $\frac{(DL_{50})}{(DL_{50})}$
<i>Peratites capitata</i>	1,49
<i>Protophila melanogaster</i>	1,35
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	1,48
<i>Eligethes aeneus</i>	1,67
<i>Myrphis unipuncta</i>	1,46
Moyenne	1,50

TABLERAU VIII

TOXICITE RELATIVE DE LA FRACTION ETHEREE PAR RAPPORT DU PRODUIT BRUT.

<u>INSECTES UTILISES DANS LES ESSAIS</u>	TOXICITE RELATIVE $\frac{(DL_{50})}{(DL_{50})}$
<i>Peratitis capitata</i>	0,65
<i>Protophila melanogaster</i>	0,92
<i>Eligethes aeneus</i>	0,55
<i>Myrphis unipuncta</i>	0,52
Moyenne	0,7



a) - Les trois produits (produit brut et les deux fractions isolées) possèdent une action insecticide.

b) - L'action toxique de ces produits est en rapport avec leur teneur en chlore.

Schématiquement on a :

TABLEAU IX

PRODUIT	TENEUR EN CHLORE	TOXICITE RELATIVE par rapport à la fraction étherée.	
		$= \frac{DL_{50}}{DL_{50}}$	
Produit brut	66,8 ± 0,2	3,1	
Fraction isolée	64,4 ± 0,2	1,6	
Fraction isolée	62,0 ± 0,2	1,0	

P A R T I E I I I

TRAVAUX SUR L'INTOXICATION AU POLYCHLOROCAMPHANE CHEZ DIVERS
=====

INSECTES
=====

Dans ce chapitre nous avons étudié quelques aspects de l'intoxication au Polychlorocamphane chez les insectes.

Ce travail a été divisé en trois parties.

Tout d'abord nous avons établi l'influence du mode d'application sur la toxicité de ce produit.

Ensuite après avoir décrit les phénomènes de l'intoxication nous avons cherché à suivre pendant toute la durée d'intoxication, les troubles qui pourraient apparaître dans quelques fonctions essentielles de l'insecte.

Nos efforts ont été essentiellement orientés sur l'étude des phénomènes respiratoires. Mais nous apportons également quelques données fragmentaires recueillies au cours de l'expérience sur les perturbations constatées au niveau du système circulatoire.

Enfin, il nous a semblé intéressant de rechercher si l'intoxication par voie orale ne se traduisait pas sur le plan histologique par des lésions du niveau de l'intestin moyen, phénomènes déjà constatés chez d'autres insectes intoxiqués par différents poisons, les arsenicaux en particulier.

A - INFLUENCE DU MODE D'APPLICATION SUR LA TOXICITE.
=====

Les insecticides avant d'arriver aux sites où se manifestera leur action toxique, doivent auparavant pénétrer à l'intérieur du corps de l'insecte, soit par voie orale, soit à travers la cuticule, soit par les stigmates.

.../...

Un insecticide qui pénètre dans l'organisme d'un insecte par voie orale peut ne pas se montrer toxique. En irritant par exemple l'épithélium intestinal, il peut provoquer des mouvements antipéristaltiques qui entraînent son élimination par vomissement ou diarrhées (3,73). L'action du pH intestinal (32) ou celle des enzymes sécrétées par l'intestin moyen peuvent le décomposer ou le rendre inoffensif.(69)

D'autre part tous les insecticides ne peuvent pas facilement traverser la cuticule. Le grand obstacle à la pénétration est en premier lieu la couche de cire et en deuxième lieu la cuticuline.

Cela explique que les insecticides de haute liposolubilité soient considérés comme d'excellents insecticides de contact. Armstrong et autres (2) travaillant sur Calandra granaria ont utilisé quatre isomères du HCH et ils ont conclu des résultats obtenus, que la pénétration d'un isomère à travers la cuticule dépendait de sa solubilité dans les solvants organiques. D'autres chercheurs (56,58) travaillant sur le D.D.T. ont observé une relation entre la sensibilité d'un insecte à cet insecticide et la solubilité de ce même insecticide dans la cire.

Mais l'insecticide qui traverse l'épicuticule trouvera en-dessous les couches d'exocuticule et d'endocuticule ayant un caractère hydrophile.

La pénétration du toxique dépendrait donc plutôt du coefficient de partage entre les deux phases.

En outre les dimensions et la structure stéréochimique de la molécule d'un insecticide, peuvent être des facteurs qui conditionnent la pénétration à travers la cuticule (51).

Enfin la cuticule n'a pas la même épaisseur dans tous les parties du corps. En déposant le Polychlorocamphane sur le dos d'une Ceratite adulte, la pénétration de celui-ci rencontrera plus de difficultés que s'il était déposé

sur le pulvillus qui est la partie vulnérable des insectes.

Une autre voie de pénétration passe par les stigmates. Les vapeurs toxiques, les huiles minérales et les émulsions à tension superficielle basse, peuvent entrer par les stigmates, passer dans les trachées et ensuite dans les organes.

I - METHODES UTILISEES.

Dans les différentes méthodes, utilisées lors de l'étude de la toxicité comparée des insecticides, intervenaient plusieurs modes de pénétration. Ainsi, même dans le cas du film toxique où la pénétration cuticulaire est vraisemblablement la plus importante on ne peut pas écarter le risque d'une contamination par voie orale. L'étude du mode d'absorption nécessite donc l'emploi des méthodes spécialisées que nous allons décrire.

a - Pénétration par contact.

Afin d'éviter la contamination par voie orale et l'élimination de la substance toxique par nettoyage, il est nécessaire de déposer la substance toxique hors de portée de la trompe et des pattes. La partie du corps la plus favorable, dans le cas des Ceratites, est le dos (tergites méso-métathoraciques). Le nettoyage de la tête par les pattes antérieures et de l'abdomen par les pattes postérieures laisse ces parties intactes.

Ainsi, seul le dos est à l'abri des mouvements qui pourraient éliminer une partie de la substance toxique déposée sur lui et permettre une contamination de l'insecte par une autre voie. D'autre part, l'espace étroit de la boîte de Petri ne permet pas aux Ceratites de voler ; dans le cas contraire les mouvements d'ailes pourraient enlever une partie de l'insecticide.

Le Polychlorocamphane était en solution hexanique ; l'hexane présente l'avantage d'être moins toxique que d'autres solvants organiques (13), le benzène par exemple. Le protocole expérimental est le suivant.:

.../...

Avec une microseringue de $1\mu\ell$ nous avons déposé sur le dos des insectes une quantité de $0,4\mu\ell$ contenant 5 γ , 10 γ ou 20 γ d'insecticide selon la dose appliquée.

Pour faciliter la manipulation nous avons engourdi les insectes par le froid ; cette technique a été préférée à l'utilisation du gaz carbonique.

Les insectes ainsi traités étaient introduits dans des boîtes de Petri. Le contrôle de la mortalité était effectué après un séjour de 24 heures dans une étuve à 22°C.

Le nombre des Ceratites utilisées était le même que celui déjà employé lors des essais sur l'étude de la toxicité comparée des trois produits.

b) - Pénétration par voie orale.

Le principe de cette méthode est d'introduire une dose connue d'insecticide par voie orale, tout en empêchant les différentes parties du corps de venir en contact avec le poison. En employant la Ceratite adulte, la seule partie du corps à venir en contact avec le poison doit être la trompe.

Différents appareils ont été montés dans ce but (29). Celui qui nous a semblé le mieux adapté à nos besoins est l'appareil décrit par VIEL et CHANCOGNE (72) et modifié par COULON.

Les bouillies insecticides de concentrations croissantes sont offertes à des Ceratites prises séparément. La quantité absorbée par l'insecte est mesurée. La mort ou la survie de chaque mouche est observée dans les 24 heures qui suivent le repas.

Description de la méthode

L'insecticide en suspension dans l'eau est offert à l'insecte dans un tube de 0,7 mm de diamètre.

.../...

.../...

Le niveau supérieur est repéré sur une échelle graduée.

La base du tube est introduite dans un orifice pratiqué dans le couvercle d'une petite cage dans laquelle on place une Ceratite. Cette microcage est formée par l'espace compris entre les fonds de deux tubes qui entrent l'un dans l'autre comme un piston.

Cet espace permet à l'insecte de se déplacer sur le fond du tube supérieur, mais non de se renverser.

Le diamètre du capillaire est tel que la Ceratite peut introduire sa trompe dans le tube.

Il est indispensable que l'insecte vienne sucer le liquide assez rapidement, car sans cela, il faudrait tenir compte d'une certaine évaporation et la détermination manquerait de rigueur.

Pour atteindre ce résultat, les Ceratites sont mises à jeûner pendant 24 heures avant l'essai et l'insecticide est dispersé dans de l'eau sucrée (10%). Le jeûne d'une part et le sucre de l'autre stimulent la prise de nourriture et obligent l'insecte à sucer le liquide offert en quelques secondes.

2 - RESULTATS

Les résultats figurent dans le tableau et le graphique suivant.

Les calculs ont été faits en tenant compte seulement de la dose administrée. Le temps d'apparition de la mortalité n'entre pas dans nos calculs, le contrôle de la mortalité ayant été fait 24 heures après l'intoxication.

Les DL_{50} sont exprimées en γ de matière active d'insecticide déposé sur le dos ou absorbé par voie orale, par insecte.

Le poids frais de Ceratite adulte variait entre 8,6 mg et 8,8 mg.

TABLEAU X

EFFICACITE COMPAREE DU POLYCHLOROCAMPHANE ADMINISTRE PAR VOIE ORALE ET PAR CONTACT. - CERATITIS.

	DOSES (en μ g par insecte)	<u>MORTALITE EN %</u>			DL 50 (en μ g par insecte)
		Ière Série	IIème Série	IIIème Série	
le	0,8	27,1	22,0	22,3	1,74
	1,6	50,0	48,3	49,6	± 0,10
	3,2	71,0	72,6	73,3	
	5	26,7	24,8	23,0	9,23
	10	48,3	52,4	55,6	± 0,82
	20	85,3	80,5	83,0	

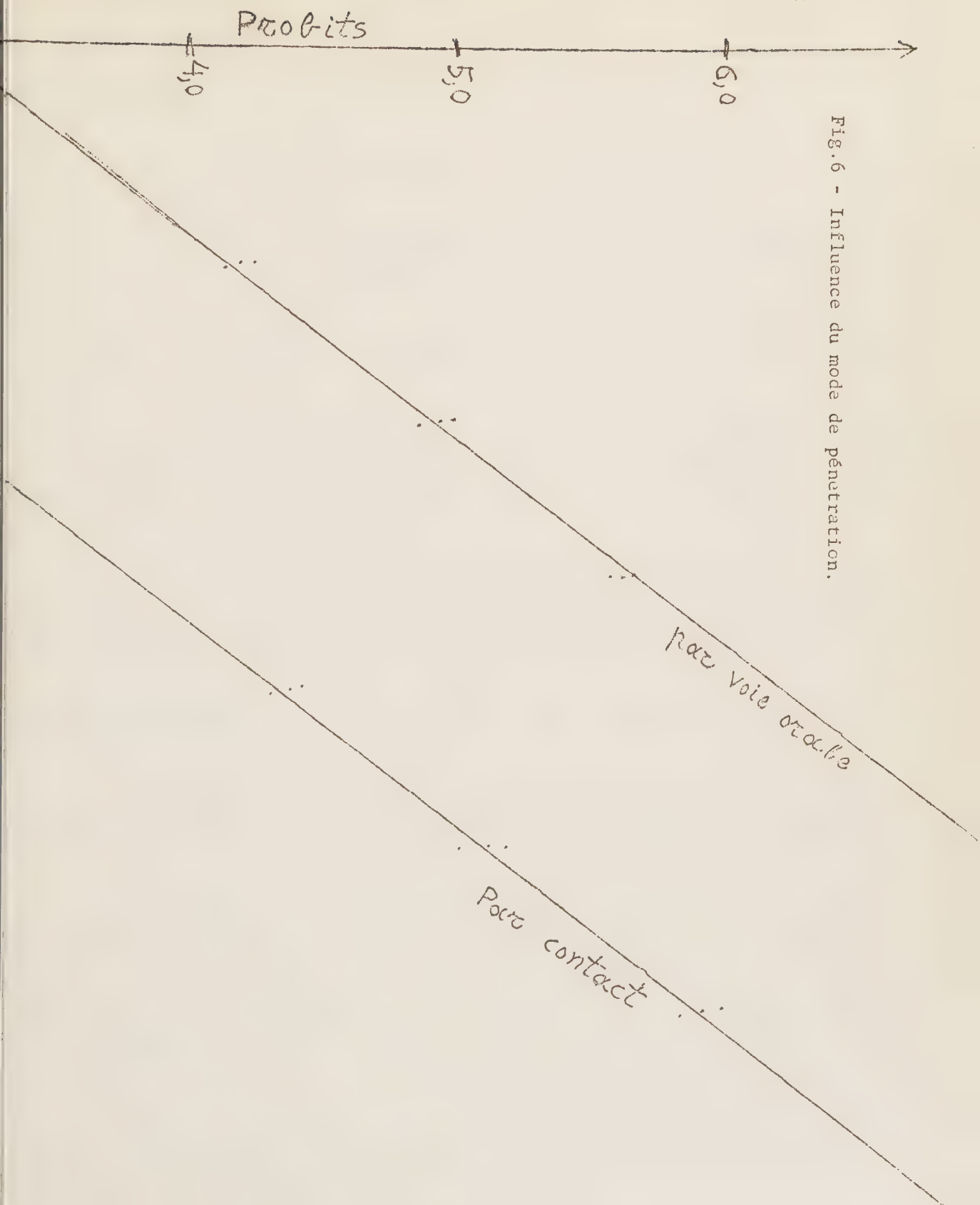


Fig. 6 - Influence du mode de pénétration.

B - CONCLUSIONS

Des résultats obtenus on peut conclure que :

- a) - L'insecticide peut pénétrer dans le corps de *Ceratitis* par voie orale aussi bien que par voie cuticulaire.
- b) - Son efficacité est 5,4 fois plus grande lorsqu'il est absorbé par voie orale.

Bien que le Polychlorocamphane soit pratiquement insoluble dans l'eau, on constate qu'il peut traverser les différentes couches de la cuticule : épicuticule, endocuticule et exocuticule.

Ce résultat est donc en contradiction apparente avec la théorie souvent émise, qui relie la pénétration d'un insecticide à l'existence d'un certain équilibre entre les propriétés liposoluble et hydrosoluble du composé.

C - TRAVAUX ANNEXES.

L'insecticide introduit dans le corps par voie orale doit traverser l'épithélium intestinal avant d'atteindre le site de l'action toxique (80).

Pilat (57) et Woke (81) décrivirent dans leurs publications les lésions de l'épithélium intestinal provoquées par les sels arsenicaux. Le premier travaillant sur la larve de Vanessa et le second sur celle de Prodenia arrivent aux mêmes conclusions : les sels d'arsenic d'une part agissent sur les noyaux (dispersion et dissolution de la chromatine) de l'autre sur le cytoplasme (apparition de grandes vacuoles) et enfin sur la membrane cellulaire (disparition de cette membrane).

Enfin peu de documents existent quant à l'action des produits chlorés sur l'épithélium intestinal (61).

C'est dans ce but que nous avons commencé quelques travaux sur l'influence de l'intoxication au P.C.C. sur l'épithélium intestinal des Ceratites adultes.

I - ETUDE HISTOLOGIQUE DE L'ACTION SUR L'EPITHELIUM INTESTINAL.

La partie du tube digestif la plus importante est l'intestin moyen. Dépourvu d'intima chitineuse, il est le siège de différentes sécrétions enzymatiques, de la digestion et de l'absorption des substances.

Nous avons effectué nos essais sur les Ceratites adultes, intoxiquées par ingestion de 7,5 γ de Polychlorocamphane.

Après leur mort nous avons prélevé leur tube digestif aux fins d'études histologiques.

a) - Méthode utilisée (80).

Le matériel étant assez délicat, la durée de la fixation du tube digestif dans le Bouin aqueux a été limitée à 24 heures.

Après une déshydratation selon la méthode classique (alcools et toluène), le tube digestif est plongé par deux fois dans un bain de paraffine de deux heures. On procède enfin à l'inclusion dans la paraffine.

Les coupes furent faites au niveau de l'intestin moyen.

Après le déparaffinage et l'hydratation nous avons procédé à la coloration des coupes.

Afin de mettre en évidence à la fois les noyaux des cellules et le cytoplasme nous avons eu recours à deux techniques de coloration.

Les noyaux sont mis en évidence en colorant les groupes aldéhydiques ^{desoxy} des riboses des A.D.N. contenus dans ces noyaux. Cette coloration est réalisée



.../...

à l'aide du réactif de Schiff.

La manipulation est la suivante :

Les acides ^{desoxy}ribonucléiques sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique normal (15 minutes dans une étuve à 60°C). Ensuite les groupes aldéhydiques sont colorés en rouge après un bain de deux heures dans le réactif de Schiff.

b) - Résultats.

Nous avons travaillé sur 10 insectes intoxiqués et 10 insectes témoins.

Du point de vue histologique cette étude rapide n'a pas révélé de différences entre insectes intoxiqués et témoins.

Les noyaux de l'épithélium avaient la même structure, absence des vacuoles dans le cytoplasme et enfin les cellules restaient en contact avec la membrane basale.

D'autre part une étude histologique sommaire au niveau des hémocytes ne nous a pas permis de constater des différences notables entre les insectes intoxiqués et les témoins.

L'intoxication au Polychlorocamphane ne semble donc pas entraîner de perturbations notables dans la répartition des différents types des hémocytes.

2 - ACTION SUR LES BATTEMENTS DU COEUR.

La circulation du sang subit l'influence des poisons.

Ainsi l'anabasine accroît quatre fois plus les battements du cœur de *Pteronomus* (63). Le même effet est provoqué par le Parathion et la Nicotine (39). Relativement à ces produits, les insecticides chlorés ont une action faible sur le rythme cardiaque (55).

.../...

Nous avons cherché à savoir si le Polychlorocamphane avait une action sur le pouls de la Chenille de Cirphis.

Les mesures ont été faites sous le binoculaire et l'aide d'un chronomètre ; les insectes étaient observés pendant toutes les phases de l'intoxication.

Les battements de coeur de la chenille dans son état normal sont de 19 à 22 par minute.

Les résultats figurent dans le tableau XI.

TABEAU XI

<u>PHASE D'INTOXICATION</u>	<u>BATTEMENTS DE COEUR PAR MINUTE</u>
Excitation	33 - 39
Temps de repos	14 - 18
Convulsions	52 - 61
Paralyse	24 - 27
Un peu avant la mort	6 - 8

Ces changements suivent de près la courbe d'absorption d'oxygène, comme on peut le constater dans le graphique suivant.

Pendant les convulsions la circulation est rapide et le pouls atteint son maximum (61) ; au contraire le pouls est très bas (18), pendant la phase de repos.

absorption d'O₂ en $\mu\text{l}/\text{heure}/\text{insecte}$

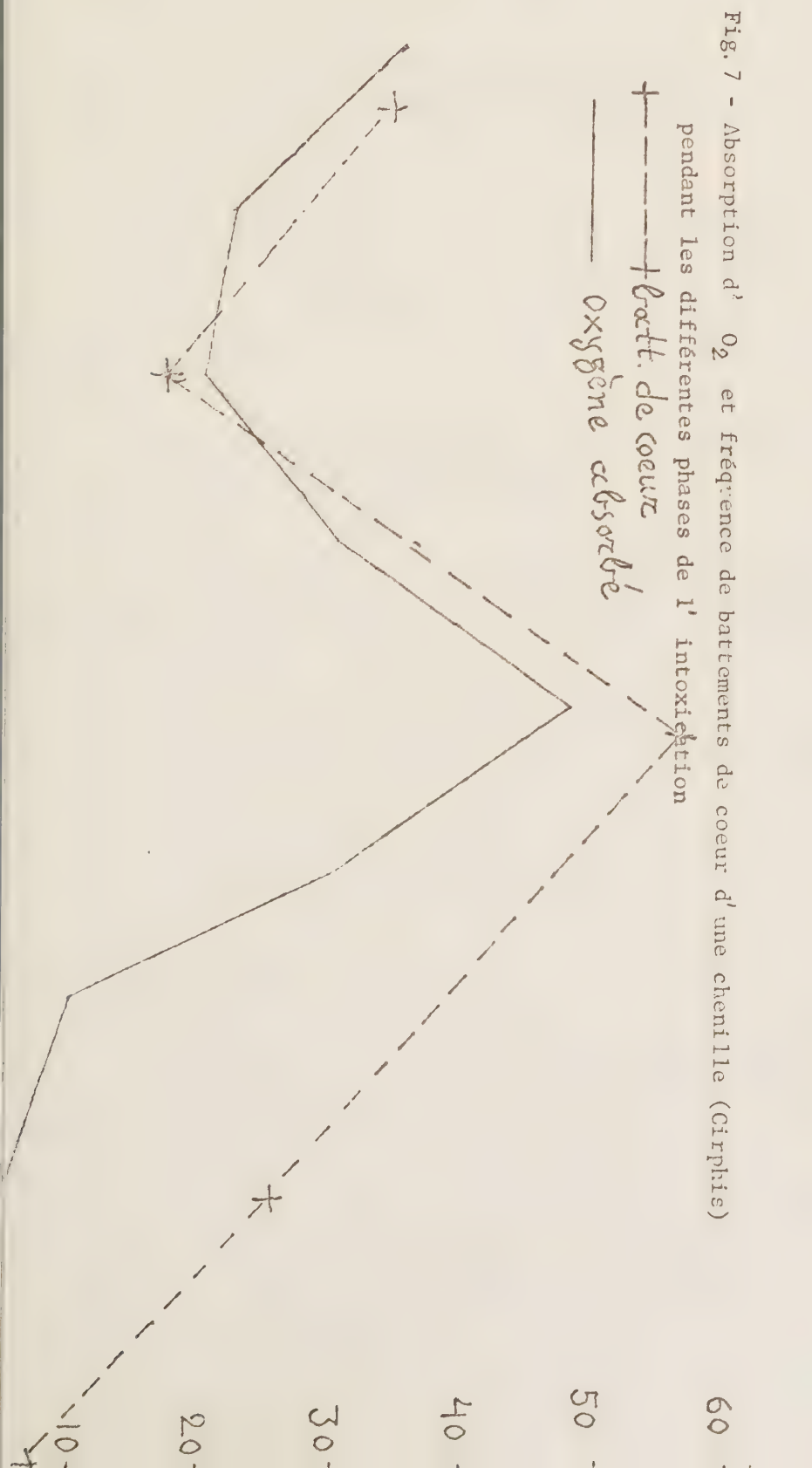


Fig. 7 - Absorption d' O₂ et fréquence de battements de coeur d'une chenille (Cirphis) pendant les différentes phases de l'intoxication

.../...

Le ravitaillement des muscles en substances nécessaires pour la respiration suivrait la courbe du pouls pendant l'intoxication.

La vitesse et l'amplitude du pouls sont sous le contrôle du système nerveux (Wigglesworth(78)). Les modifications du pouls seraient donc une conséquence des perturbations du système nerveux.

C - ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE L'INTOXICATION.

L'action principale des insecticides chlorés s'exerce sur le système nerveux des insectes.

Or la respiration, la circulation du sang, les systèmes musculaires etc. sont sous le contrôle du système nerveux.

De sorte que l'application d'un insecticide chloré entraîne des modifications dans le comportement de l'insecte, des troubles dans le métabolisme et dans la respiration.

Nous avons cherché à examiner l'influence du Polychlorocamphane.

- a) - sur le comportement de l'insecte
- b) - sur les phénomènes respiratoires.

D - SYMPTOMATOLOGIE.

L'application d'un insecticide provoque généralement chez le sujet l'apparition d'une série de symptômes qui permettent parfois d'identifier le groupe chimique auquel appartient le toxique.

Il était donc intéressant de rechercher si l'application du P.C.C. conduisait à des manifestations typiques ou si au contraire on se trouvait en présence d'une réponse classique comme on peut la rencontrer lors de l'utilisation de n'importe quel insecticide chloré.

.../...

Nous décrivons cette symptomatologie chez deux insectes : la ceratite adulte et la chenille de *Cirphis*. Ces insectes furent traités par le dépôt d'une certaine quantité de P.C.C. sur la région dorsale du thorax.

a) - Cératites

Phase d'excitation.

On note un accroissement de la fréquence des mouvements de nettoyage au niveau des pattes antérieures et postérieures. Ces mouvements s'intensifient au fur et à mesure de l'intoxication.

Il apparaît une certaine incoordination. L'insecte perd l'orientation dans la marche. On observe des translations latérales voire même des phénomènes de recul.

La protraction et la rétraction de la trompe sont plus fréquemment observées que chez les témoins.

Phase de convulsions.

L'hyperexcitation de l'insecte se traduit par des déplacements continus sur un rythme rapide.

De leur côté les ailes se mettent à battre à une fréquence extrêmement élevée. Jamais nous n'avons pu observer un phénomène d'une telle intensité chez les ceratites volant dans la cage, d'élevage ou ailleurs.

A ce stade le sens de l'orientation semble avoir disparu. Ainsi les battements d'ailes font tourbillonner l'insecte intoxiqué autour d'un axe imaginaire, tantôt sur le dos, tantôt debout.

Phase de paralysie.

Cette phase est dominée par la disparition totale de la coordination entre les différents centres ganglionnaires.

La Ceratite ne peut plus se tenir sur ses pattes qui restent pourtant animées de mouvements très rapides.

Par stimulation, on peut encore provoquer certains mouvements de la trompe.

Puis l'insecte entre dans le coma.

b) - Chenille de Cirphis.

Phase d'excitation

On observe une accentuation des mouvements qui normalement président à la recherche de la nourriture.

La chenille lève la tête et le thorax, dressée sur ses fausses pattes. Ce mouvement est suivi par une rotation des parties du corps ainsi élevées.

Les pièces buccales fonctionnent sans être stimulées.

La chenille se déplace rapidement.

Phase de "repos".

Après les premières heures d'intoxication la chenille semble épuisée. Peu à peu les mouvements cessent, et elle tombe dans une immobilité quasi totale.

Les pièces buccales fonctionnent toujours, mais après stimulation.

.../...

Phase de convulsions.

Après ce temps de repos, l'excitation de la chenille s'accroît.

Les mouvements sont plus brusques que pendant la première phase de l'intoxication.

Après chaque élévation et rotation de la tête et du thorax, l'insecte tombe sur le dos en se tordant.

Le corps prend tantôt la forme d'un S, tantôt celle d'un arc. Ces mouvements se succèdent périodiquement.

La fin des convulsions est marquée par l'excrétion de la totalité du contenu du tube digestif.

Il ne s'agit pas d'une simple régurgitation de liquide intestinal qu'on peut observer chez les chenilles non intoxiquées.

Après le vomissement du contenu du tube digestif, la chenille a l'aspect d'un sac vide. Son volume réduit la ramène aux dimensions du stade précédent.

Les pièces buccales continuent de se mouvoir mais l'insecte n'est plus capable de réabsorber le liquide intestinal excrété.

Phase de paralysie.

Après l'excrétion du liquide intestinal, la chenille tombe subitement dans un état d'immobilisme complet.

Elle répond cependant aux stimuli.

Cette phase se prolonge pendant quelques heures et se termine par la mort.

.../...

.../...

Conclusions.

Pendant les différentes phases de l'intoxication, les appendices restent en fonctionnement. Chez les Ceratites, les pattes et les ailes continuent leur mouvement pendant toute l'intoxication ; de même, chez les chenilles, les pattes et les fausses pattes fonctionnent jusqu'à la fin des convulsions.

Mais ces mouvements sont atypiques. Ils ne semblent pas sous la dépendance des centres supérieurs ; leur fréquence élevée révèle d'ailleurs l'absence de l'action inhibitrice-régulatrice du cerveau et de la masse ganglionnaire sous-oesophagienne, ce qui confirme l'hypothèse précédente.

Les expériences classiques de Von Buddenbrock (10), Ten Cate (68) et Wigglesworth (73) ont d'ailleurs montré que les ganglions thoraciques peuvent fonctionner même si un segment est isolé des autres, grâce à l'autonomie des ganglions chez les insectes.

D'autre part les pièces buccales et les antennes peuvent fonctionner très longtemps ce qui prouve que les centres antennaires et les parties de la masse sous-oesophagienne correspondant à l'innervation des pièces buccales résistent à ce type d'intoxication.

Bot (6) travaillant sur Periplaneta americana et sur Calliphora constate que tandis que le D.D.T stimule les nerfs moteurs des pattes isolées, le toxaphène n'exerce son action que sur le système nerveux central.

Le P.C.C. qui est un produit voisin de Toxaphène, pourrait avoir une action similaire.

Selon toute probabilité son influence essentielle porte sur la coordination entre les différents centres nerveux d'où les mouvements déséquilibrés des appendices. Peut-être a-t-il une action sur le système stomatogastrique ; les vomissements incoercibles qui entraînent l'excrétion de la totalité du tube digestif serait une conséquence de cette excitation à caractère tétanique.

.../...

.../...

- ACTION SUR LES PHENOMENES RESPIRATOIRES.

L'application de substances toxiques et en particulier celle des insecticides chlorés, modifie considérablement le comportement de l'insecte traité.

La tétanisation qui est la conséquence fréquente de cette intoxication conduit à une perturbation marquée des phénomènes respiratoires.

On note à la fois un accroissement de la consommation d'oxygène et une modification du quotient respiratoire.

L'accroissement de la consommation d'oxygène a été étudié par Lord (42, 3) Harvey, Brown (31) et autres. Ces différents auteurs ont observé que la consommation d'O₂ augmente avec l'intensification des mouvements spasmodiques de l'insecte et décroissent à mesure que ceux-ci s'affaiblissent.

Lord travailla sur Oryzaephilus et Tribolium intoxiqués par divers insecticides chlorés et phosphorés. Les courbes de respirations sont constituées d'une partie ascendante et d'une descendante. Aux mêmes résultats aboutirent les expériences de Harvey et Brown sur Blattella.

Peu de chercheurs, pourtant, ont abordé le problème des modifications du quotient respiratoire, pendant l'intoxication.

Buck et Keister (7) constatent une augmentation progressive du quotient respiratoire chez les larves et les adultes de Phormia intoxiqués au DDT. D'après ces auteurs l'excitation aurait provoqué une utilisation accrue des glucides, le changement du quotient respiratoire chez les larves correspondrait à une quantité onze fois plus grande des glucides oxydés.

Les données bibliographiques sont donc insuffisantes, et pourtant l'étude du Q.R. pourrait donner des informations très intéressantes sur le métabolisme de l'insecte intoxiqué.

.../...

Il nous a paru intéressant d'étudier ces deux phénomènes dans le cas particulier de l'intoxication au Polychlorocamphane.

A - ABSORPTION D'OXYGENE.

a) - Méthode utilisée.

L'utilisation des respiromètres dans les expériences sur les insectes fut envisagée par de nombreux chercheurs (519,53,60).

Pour nos essais sur l'absorption d'oxygène pendant l'intoxication, nous nous sommes servis des respiromètres de Warburg à volume constant.

Les fioles avaient environ 15 ml de volume ; un puits central contenait 0,2 ml de KOH aqueux à 10 % et un papier filtre (2 X 2 cm), pour l'absorption du gaz carbonique.

Dans chaque fiole, un seul insecte était introduit ; l'insecticide n'agissant pas avec la même vitesse sur tous les individus d'un même lot nous avons obtenu une série de courbes individuelles.

L'insecte étant introduit dans la fiole, le respiromètre est transporté dans un bain à 25°C. Cette température est maintenue constante pendant toute l'expérience.

Après une heure de stabilisation thermique, nous fermons le manomètre.

Les mesures de dénivellations sont faites, jusqu'à la mort de l'insecte, toutes les heures.

Chaque mesure correspond à la diminution de volume provoquée par l'absorption de l'oxygène pendant une heure.

Le calcul du volume de l'oxygène absorbé (en μl) fut effectué par la formule suivante (70) :

$$V_{O_2} = \left\{ \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P} \right\} \cdot h_{O_2} (1)$$

où V_g = le volume de la phase gazeuse dans la fiole et le tube du manomètre jusqu'à la surface du liquide de Krebs.

V_f = le volume de la solution potassique dans le puits central.

T = la température absolue du bain (= 273 + température en °C).

α = la solubilité de l'oxygène dans le liquide à la température T

P_o = la pression standard, égale à 760 mm de mercure ou 10.000 mm du liquide Krebs.

$$K_{O_2} = \text{constante particulière de la fiole utilisée} = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_o}$$

H_{O_2} = dénivellation en mm entre la lecture initiale et la lecture finale.

Le calcul de la constante K_{O_2} était fait séparément pour chaque fiole étant donné que les fioles n'avaient pas le même volume.

Le volume V_g était calculé en tenant aussi compte du volume de l'insecte.

b) - Les essais.

Dans les premières expérimentations que nous avons réalisées, nous avons cherché à comparer l'influence du mode d'intoxication sur la consommation de l'oxygène.

Les insectes utilisés dans ce travail étaient des Ceratites adultes.

Ces insectes étaient intoxiqués par voie orale et par pénétration à travers la cuticule selon les méthodes déjà décrites.

Par la suite nous avons cherché à savoir si d'autres insectes se comportaient de façon similaire à la Ceratite. Pour cela nous avons utilisé les insectes appartenant à une famille très différente : les chenilles de Cirphis.

Le processus d'intoxication s'étant révélé différent pour ce dernier insecte, nous avons tenu à savoir si cette différence était due à la nature de l'insecte lui-même ou au contraire s'il s'agissait d'une réaction particulière de ce lépidoptère au Polychlorocamphane.

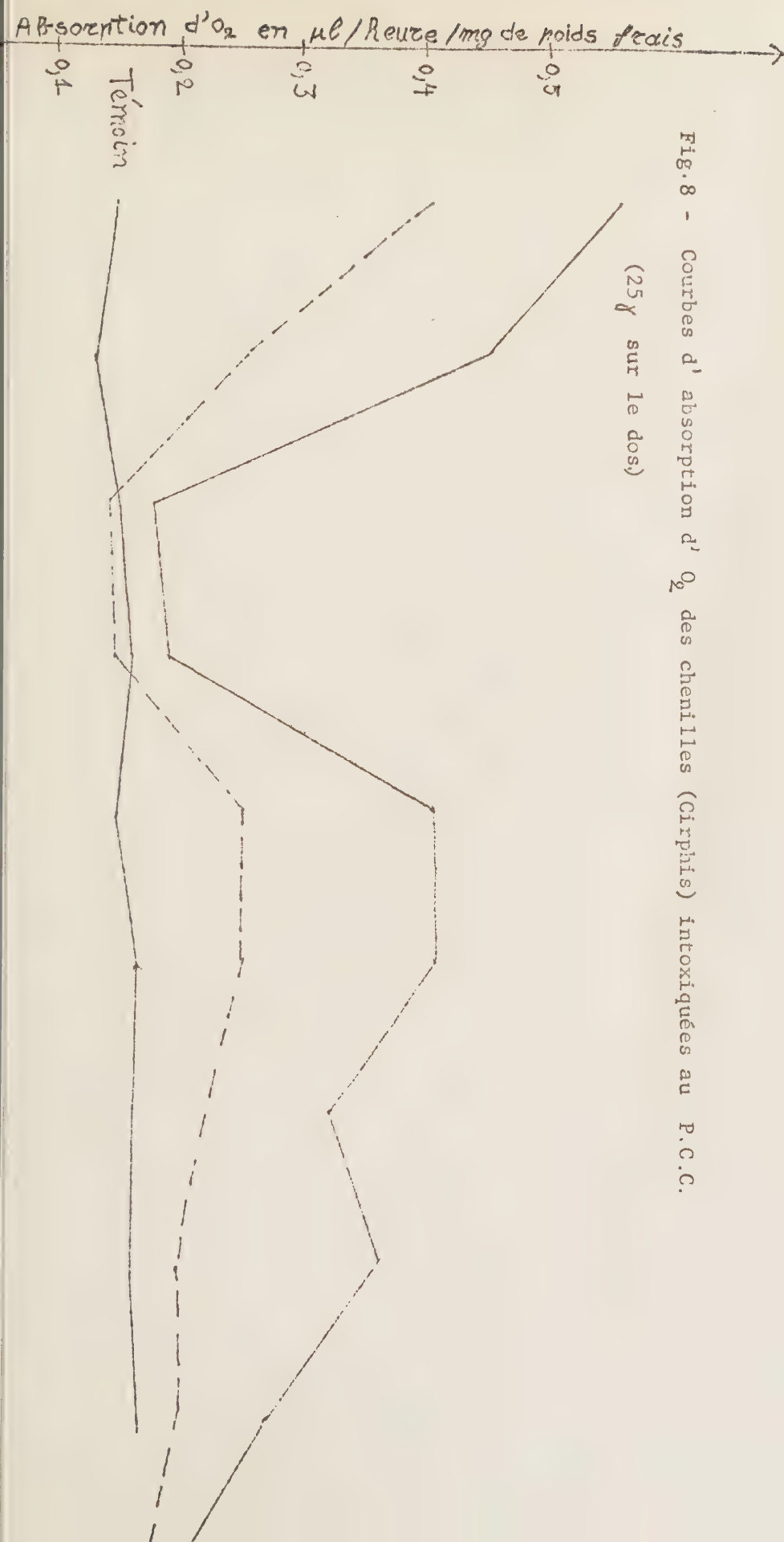
Dans ce but nous avons étudié comparativement l'action du Polychlorocamphane, celle du D.D.T et celle de l'H.C.H.

Les doses utilisées pendant les différents essais étaient les suivantes :

INSECTICIDES	INSECTE	POIDS DE L'INSECTE	METHODE d'APPLICATION
Polychlorocamphane	Ceratites	8,6 mg	par contact
-	-	8,6 mg	par voie orale
-	Cirphis	200,0 mg	par contact
Lindane	-	200,0 mg	par contact
D.D.T	-	200,0 mg	par contact

c) - Les résultats.

Les résultats figurent dans les graphiques suivants. Ils sont exprimés en mm^3 , d'O₂ absorbé par mg de poids frais.



Absorption d'O₂ en $\mu\text{l}/\text{Heure}/\text{mg}$ de poids frais

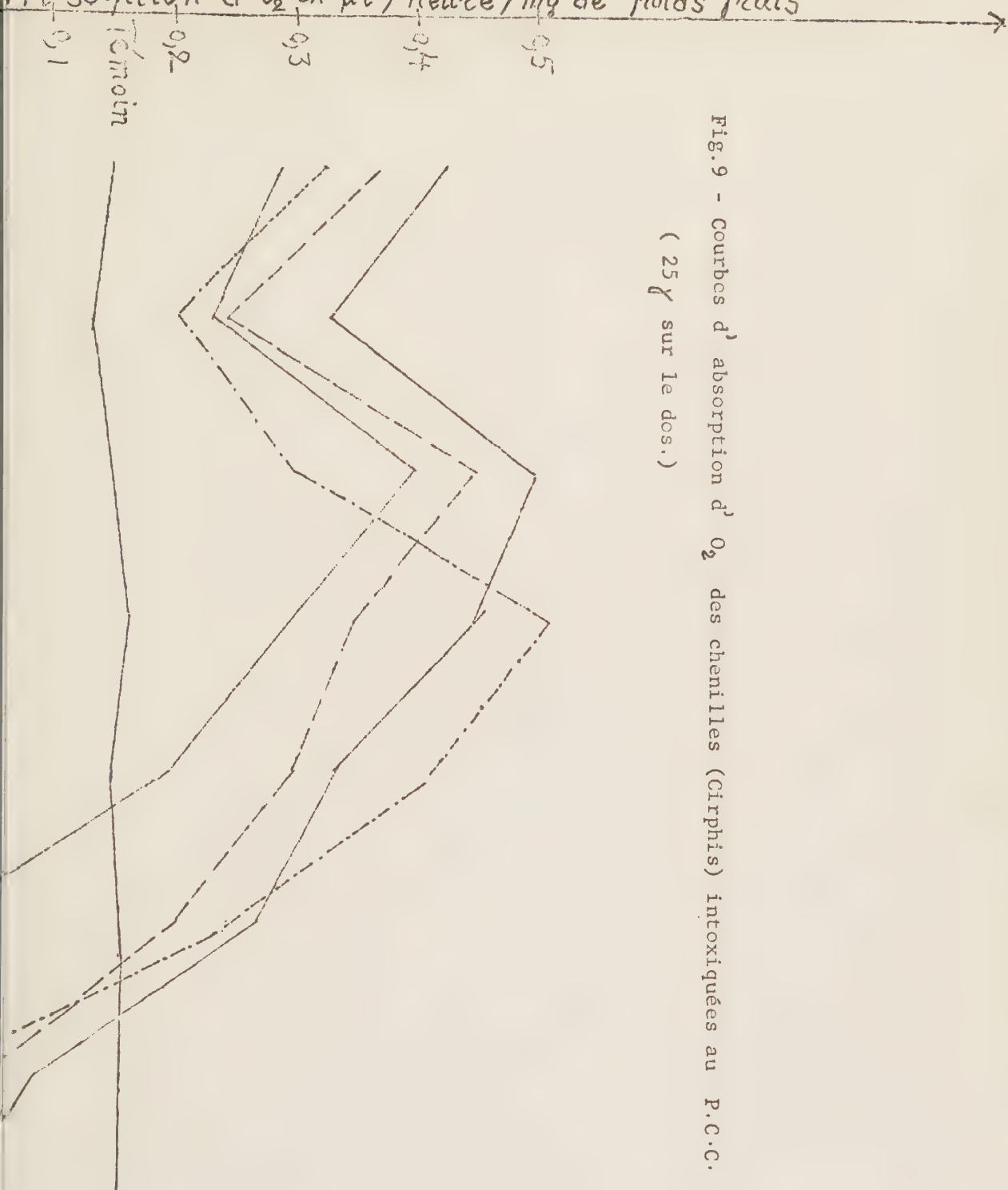


Fig. 9 - Courbes d'absorption d'O₂ des chenilles (Girphis) intoxiquées au P.C.C.
(25 γ sur le dos.)

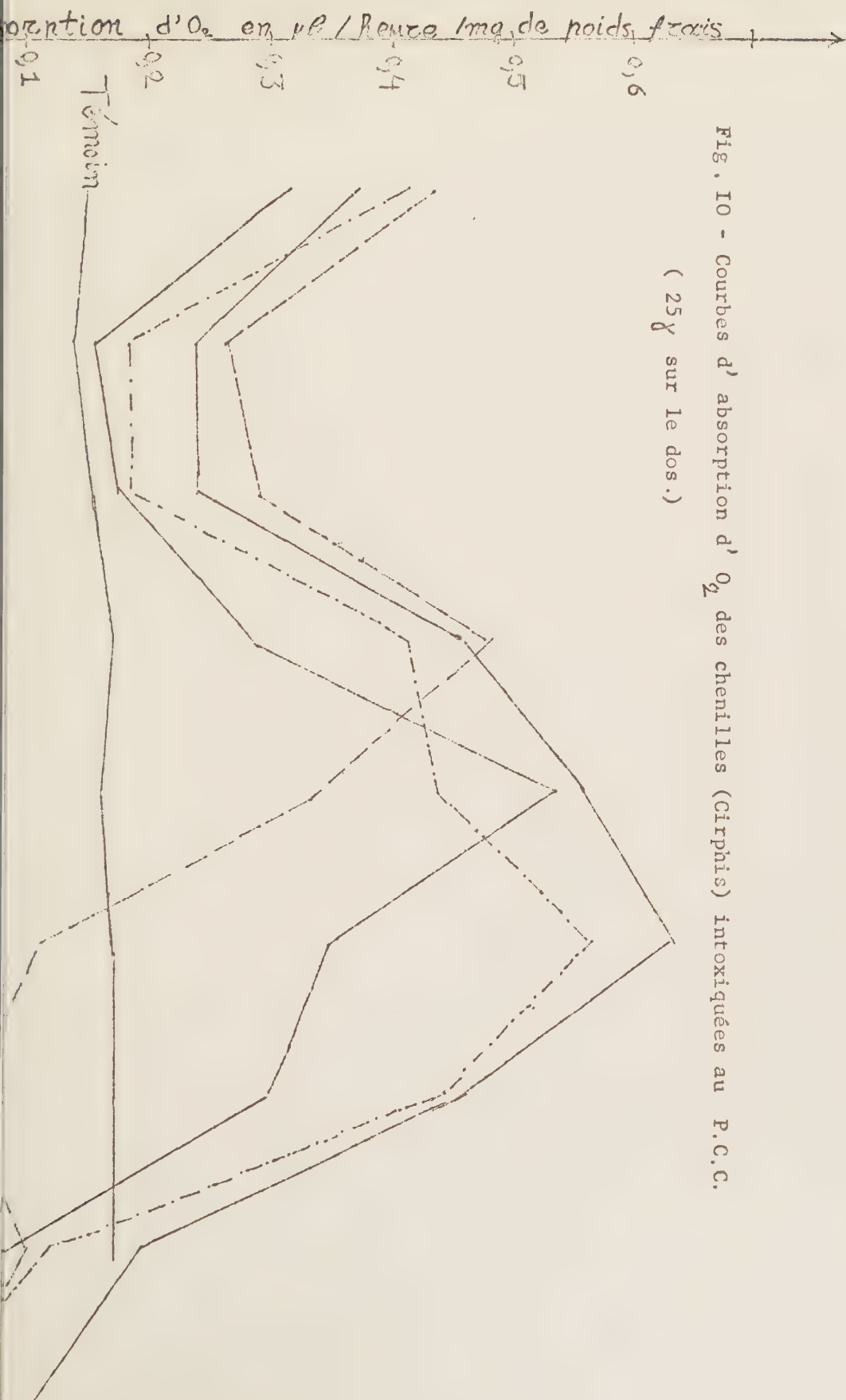
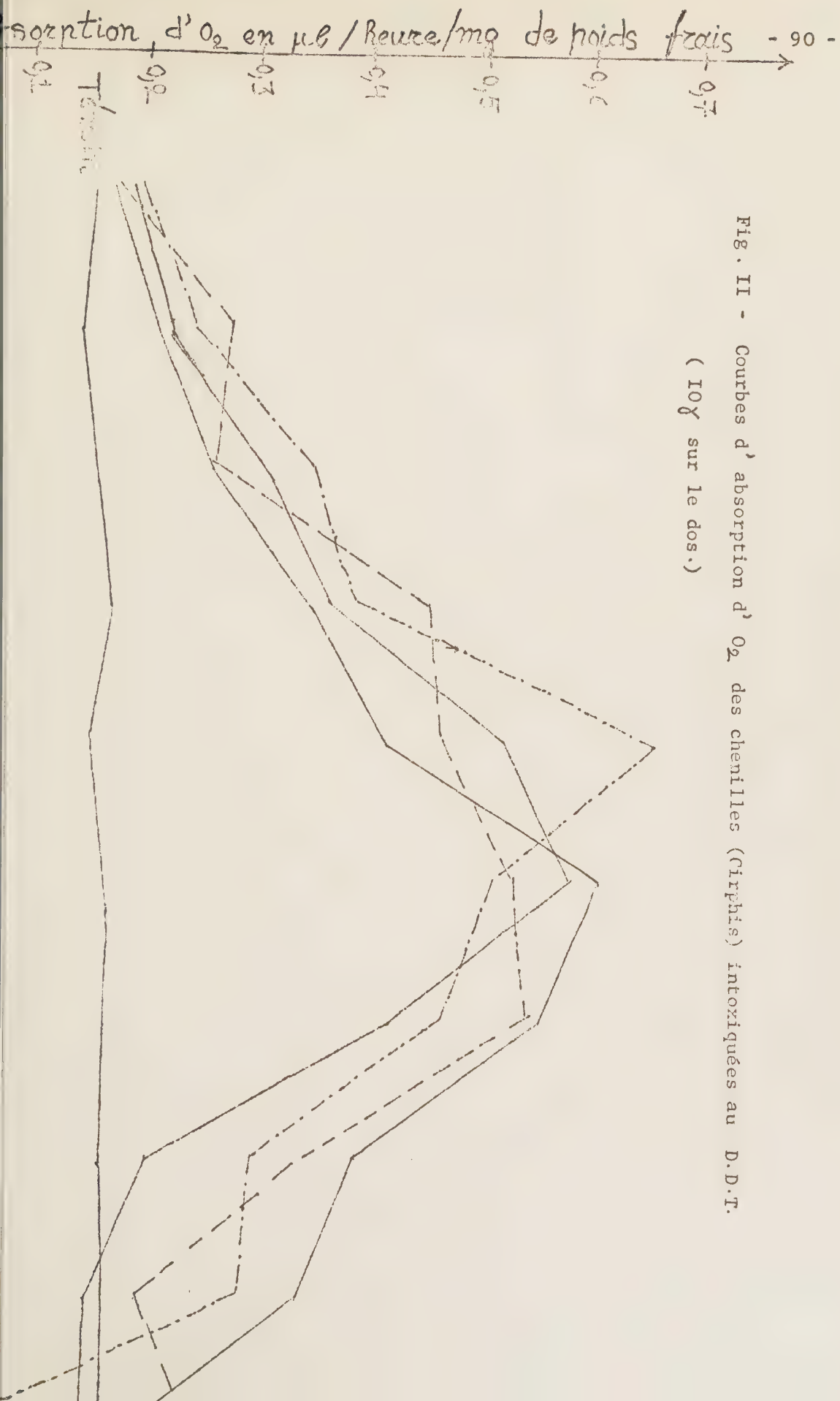
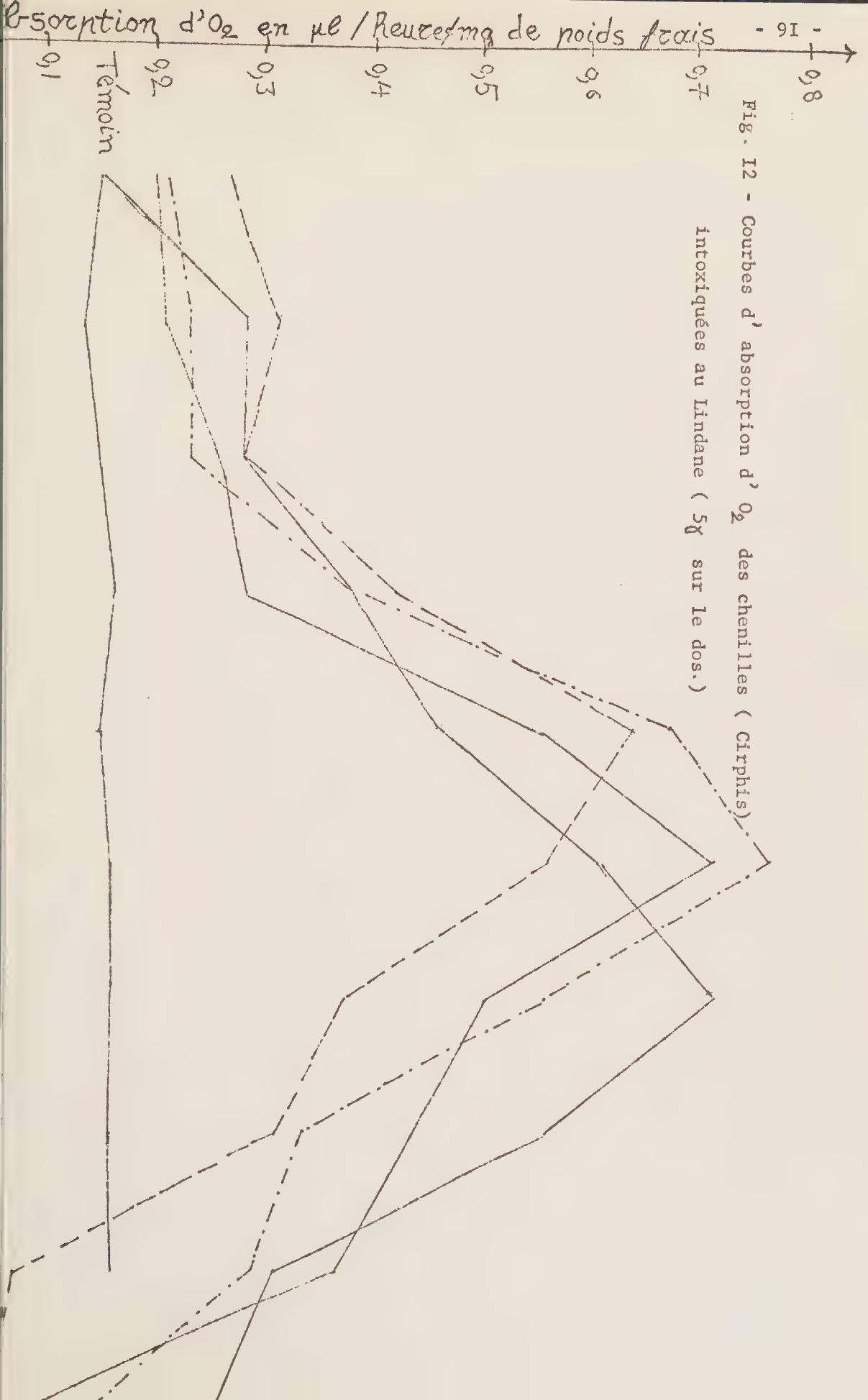
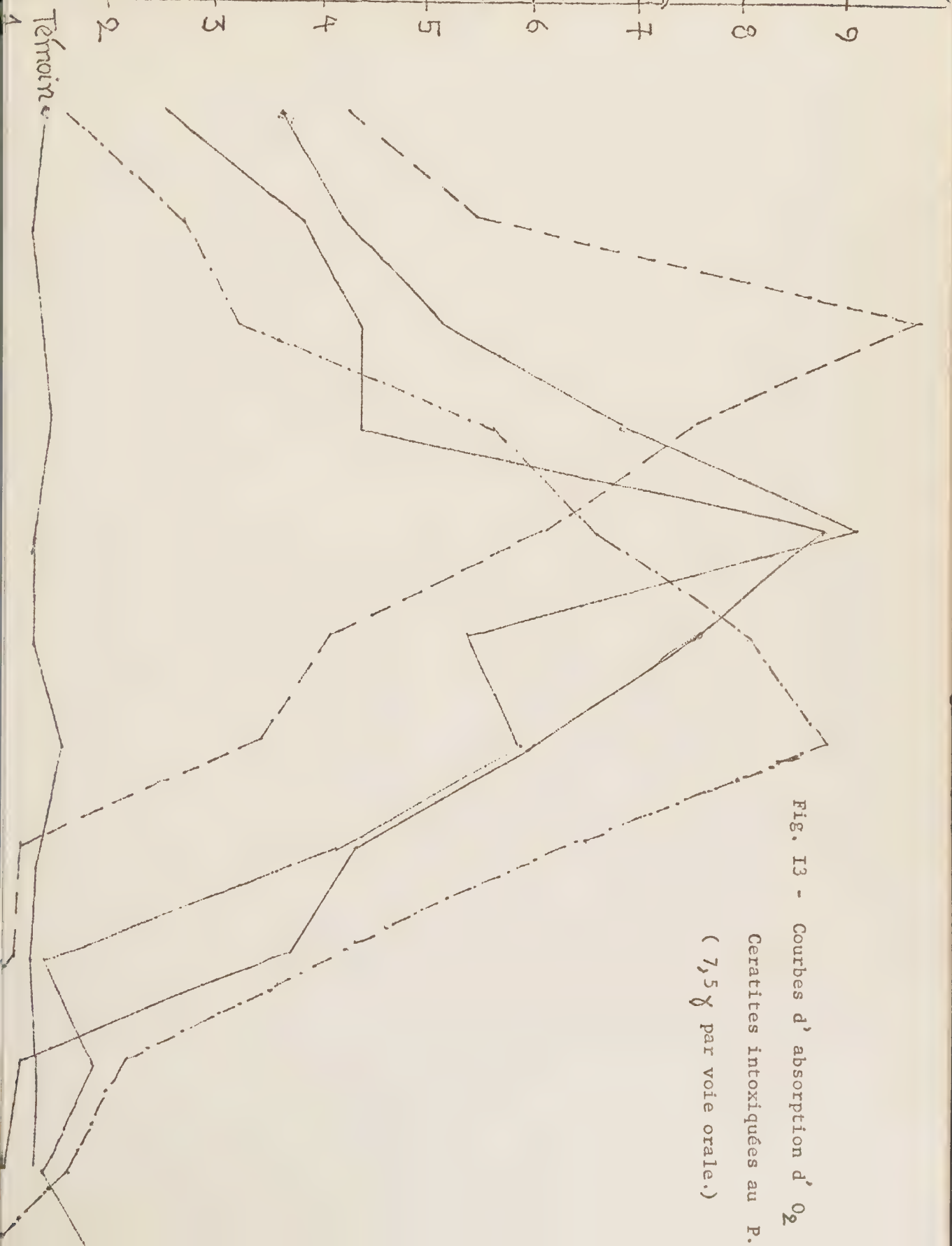


Fig. 10 - Courbes d'absorption d'O₂ des chenilles (Cirphis) intoxiquées au P.C.C.
(25 γ sur le dos.)





absorption d'O₂ en μ l / heure / mg de poids frais



sorption d'O₂ en $\mu\text{l}/\text{Kerze}/\text{mg}$ de poids frais

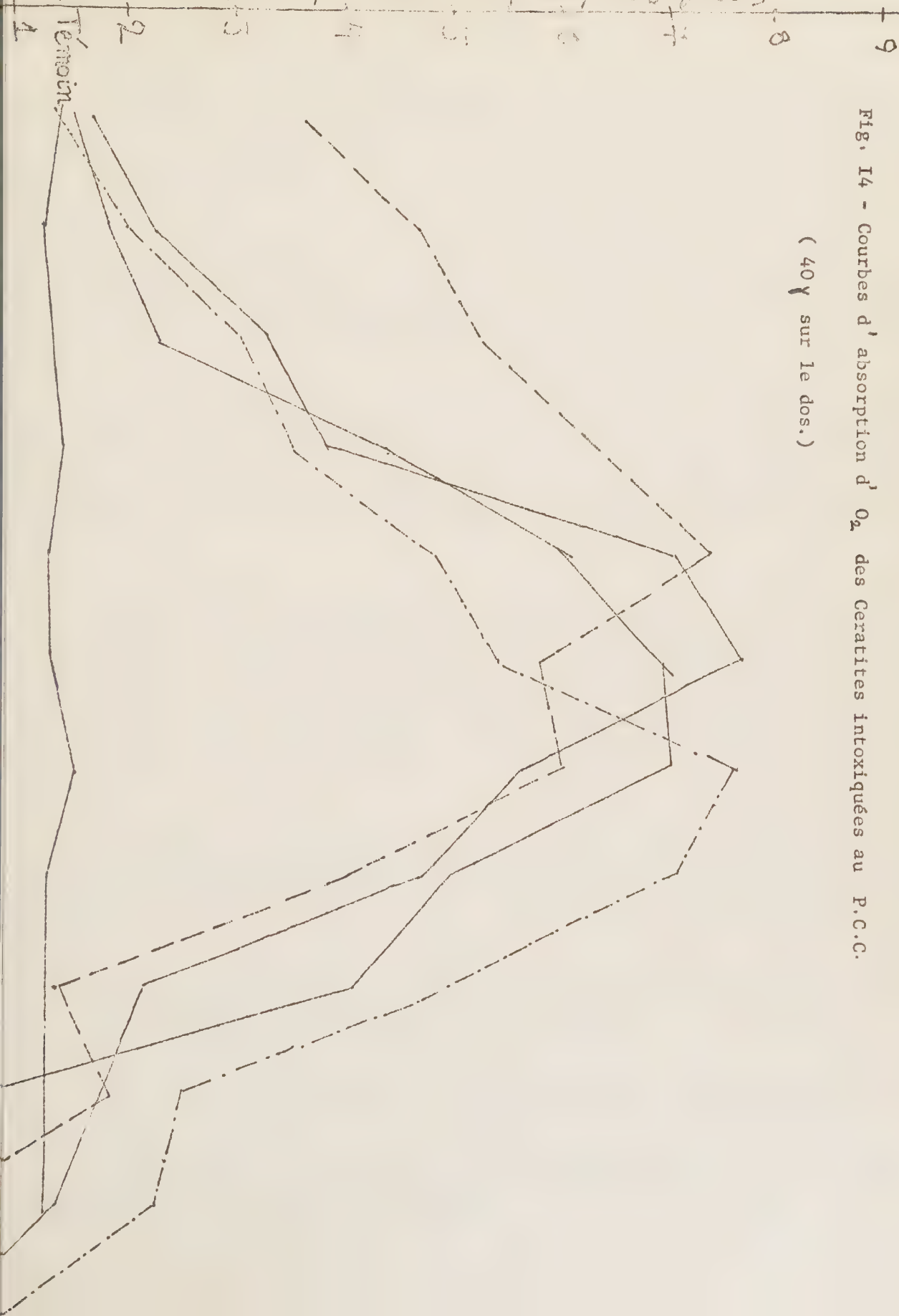


Fig. 14 - Courbes d'absorption d'O₂ des Ceratites intoxiquées au P.C.C.

(40% sur le dos.)



Les courbes d'absorption d'oxygène, obtenues à partir des Ceratites intoxiquées au Polychlorocamphane, ne présentent pas de différences notables qu'il s'agisse des Ceratites traitées par voie orale ou de celles traitées par contact (Fig. 13 et 14).

La forme de ces courbes est en général comparable à celles obtenues par Lord et les autres chercheurs (31,43) travaillant avec le D.D.T, le Lindane et autres produits chlorés sur Oryzaephilus et Tribolium.

Le témoin absorbe 1,3 à 1,5 μl d'O₂ par heure et mg de Ceratite. Pendant la phase de convulsion, les insectes traités par voie orale, consomment 6 fois plus d'oxygène que les témoins, tandis que ceux qui furent traités par contact, pendant la même phase, n'en consomment qu'une quantité quatre fois supérieure.

Les chenilles de Cirphis présentent un intérêt particulier car après les deux premières heures d'excitation la consommation d'oxygène tombe au niveau des témoins. En consultant les graphiques présentés par d'autres chercheurs nous n'avons pu retrouver aucune courbe de ce type. Ce point bas correspond à la phase de "repos" que nous venons de décrire dans la symptomatologie de l'intoxication.

Les trois graphiques que nous présentons (Fig. 8, 9 et 10) ont été établis à partir des résultats obtenus pour 10 chenilles intoxiquées au Polychlorocamphane.

Dans le premier graphique (Fig. 8) deux des chenilles intoxiquées survécurent ; leur résistance étant particulièrement forte.

La chute de la consommation d'oxygène est dans ce cas bien marquée.

Dans le second (Fig. 9) et le troisième (Fig. 10) graphique les chenilles succombèrent à l'action du Polychlorocamphane.



La chute de la consommation d'oxygène est donc plus accentuée chez les chenilles atteintes tardivement par l'insecticide.

Dans les deux derniers graphiques (Fig. 11, 12.) figurent les courbes de consommation d'O₂ des chenilles traitées au lindane et au D.D.T. Ces courbes ont la-même forme que celles données pour les Ceratites : les convulsions suivent l'excitation sans l'insertion d'une phase de "repos".

L'excitation commence au niveau des témoins et s'accroît progressivement, tandis que chez les Cirphis intoxiquées au Polychlorocamphane, dès le commencement de l'intoxication, la consommation d'O₂ est 2,3 fois plus grande que chez les témoins.

d) - Conclusions.

Il n'y a pas de différence dans l'action du Polychlorocamphane sur les Ceratites lorsque l'on change le mode d'application du poison.

L'action du Polychlorocamphane sur la respiration des Cirphis n'est pas la-même que chez les Ceratites.

La baisse de la consommation d'O₂ pendant la phase de "repos" est due à une réaction particulière de la Cirphis au Polychlorocamphane. L'excitation brusque des deux premières heures aurait provoqué une perturbation profonde qui se manifeste par un épuisement et une chute de la consommation d'oxygène pendant la phase de "repos".

B - LE QUOTIENT RESPIRATOIRE.

La baisse de la consommation d'oxygène pendant la phase de repos nous a amené à étudier le quotient respiratoire de la Cirphis intoxiquée au Polychlorocamphane. Nous avons cherché à savoir si ce phénomène n'entraînait pas une modification du quotient respiratoire.



Le quotient respiratoire (Q.R.) chez les insectes n'est pas constant. Il varie selon l'espèce, le stade, le régime alimentaire, l'état physiologique, la température etc...

Wigglesworth constate que chez les Drosophiles le Q.R. se maintient à un niveau voisin de l'unité (72). Chez les lépidoptères le Q.R. est assez bas, ce qui tend à prouver que les substances utilisées par la respiration sont plutôt de nature lipidiques (53). Chauvin donne quelques chiffres sur la variation du Q.R selon le régime alimentaire (15).

Le Q.R. est généralement égal ou inférieur à l'unité. Mais il y a des cas où le Q.R. peut avoir une valeur plus grande que l'unité ; le Q.R. devient 1,2 ou 1,5 lorsqu'il y a une conversion des glucides en lipides (26).

Un cas intéressant dans la modification du Q.R. est la rétention du gaz carbonique, observée chez les larves et les pupes en hibernation (22,5255), ou chez les insectes, ayant vécu pendant un certain temps en anaérobiose (21,2).

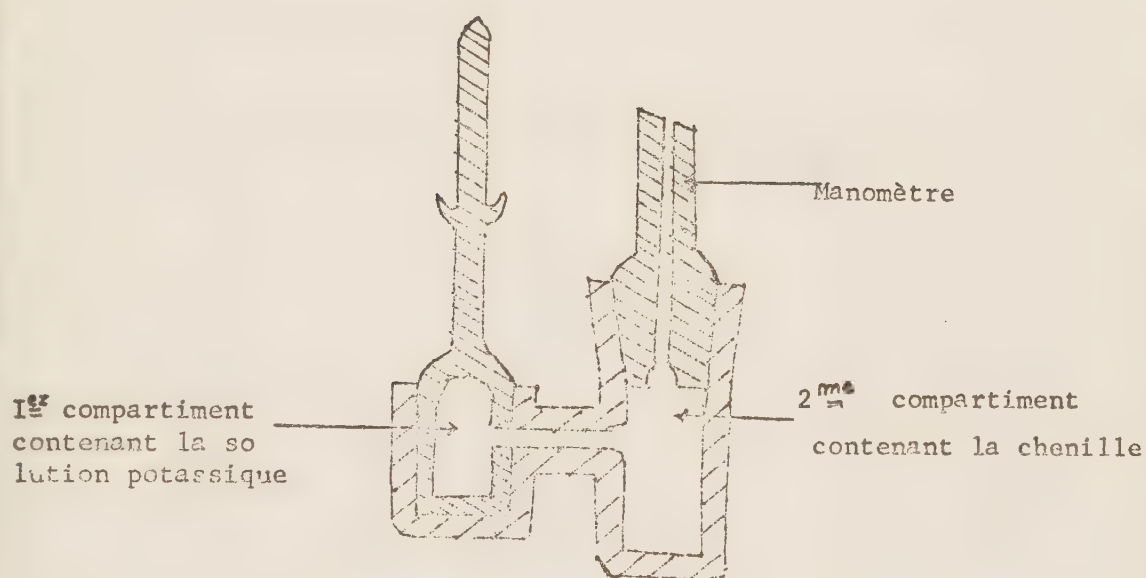
a) - Méthode utilisée.

Nous avons utilisé un respiromètre dont les fioles étaient d'un type spécial. Ces fioles étaient composées de deux compartiments, pouvant être mis en communication à volonté. Le volume du premier compartiment était d'environ 4 ml et celui du second 1 ml. Le premier compartiment, qui était en contact avec le manomètre, servait pour la mesure du volume total des gaz échangés ; il renfermait la chenille. Le second compartiment contenait 0,2 ml d'une solution aqueuse de KOH (10%). En mettant en communication les deux compartiments, le CO₂ dégagé, était absorbé par le KOH ; ce qui permettait de mesurer la consommation d'O₂. (Voir figure 15).

Ces différences mesures étaient réalisées dans l'ordre suivant :



Fig. 15 - Fiole utilisée pour les mesures du Quotient Respiratoire.

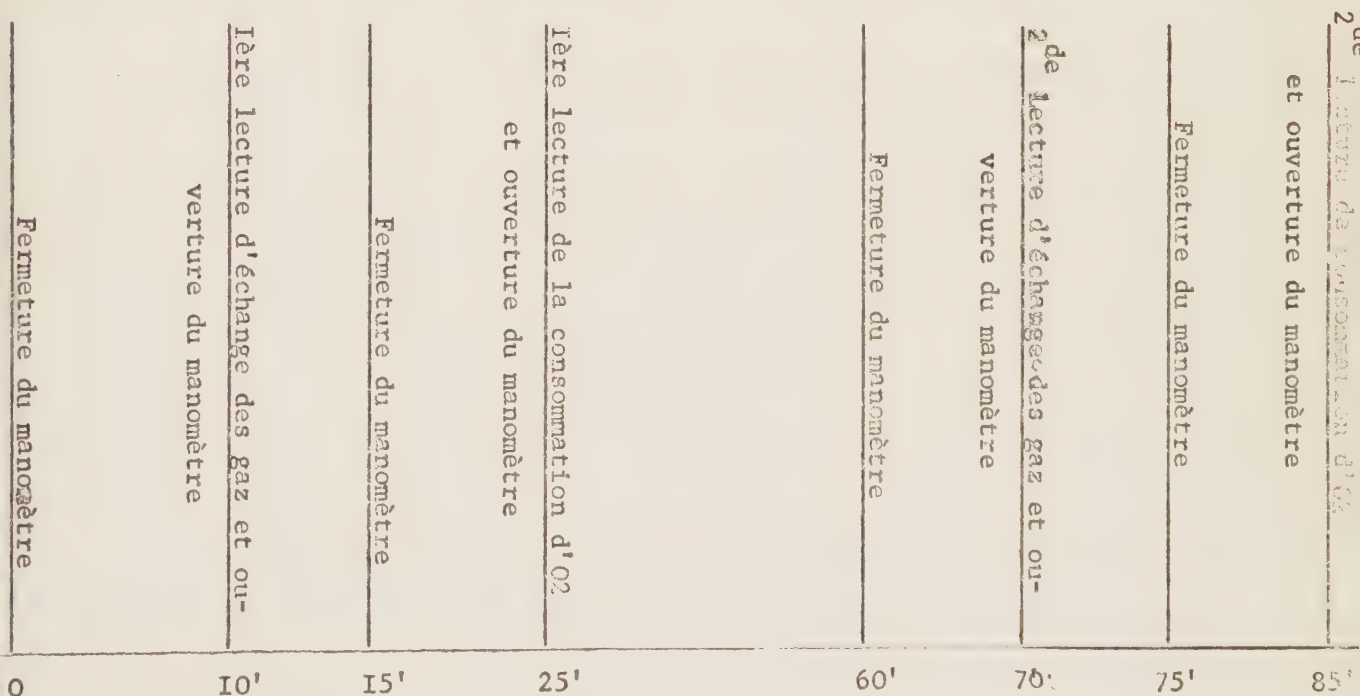




- 1 - Mesure du volume total des gaz échangés ; durée : 10 minutes
- 2 - Phase d'équilibration ; durée : 5 minutes (manomètre ouvert)
- 3 - Mesure du volume d'oxygène consommé ; durée : 10 minutes
- 4 - Phase d'attente ; durée : 35 minutes (manomètre ouvert)

Puis le cycle recommençait.

Cette méthode nous permettait de suivre l'évolution des échanges respiratoires heure par heure jusqu'à la mort de l'animal intoxiqué.



SCHEMA DU CYCLE EXPERIMENTAL



Etant donné qu'il y avait un délai d'I/4 d'heure entre la mesure de l'O₂ consommé et celle de l'échange des gaz, la détermination du Q.R. ne peut être fait à partir des données ainsi obtenues.

Nous avons donc admis que la variation d'oxygène consommé était linéaire entre deux mesures successives. Dans ces conditions il nous était possible de calculer la quantité d'oxygène qui serait consommée au moment de la mesure des échanges de gaz, en appliquant la formule suivante :

soit :

$1^{h}O_2$ la dénivellation correspondant à la consommation d'oxygène à l'heure X

$2^{h}O_2$ la dénivellation correspondant à celle de l'heure X + 60 minutes

la dénivellation à l'heure X + 45 minutes sera :

$$h'O_2 = 2^{h}O_2 - \frac{2^{h}O_2 - 1^{h}O_2}{4} \quad (2)$$

Le calcul du volume d'oxygène consommé pendant les 10 minutes de chaque mesure est alors effectué selon la formule déjà décrite.

Le volume de CO₂ est calculé par la formule :

$$V_{CO_2} = h.k - h'O_2 \cdot k_{O_2}$$

où :

h = la dénivellation d'échange des gaz correspondant à l'heure X + 45

$h'O_2$ = la dénivellation d'oxygène consommé correspondant à l'heure X + 45



K_{O_2} = la constante particulière de la fiole utilisée (deux compartiments).

K = la constante de la fiole principale lorsque les deux compartiments ne sont pas en contact :

$$\frac{V_g \cdot \frac{273}{T}}{P_o}$$

Enfin le quotient respiratoire est calculé par la formule suivante :

$$Q.R. = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$$

b) Résultats.

Les quotients respiratoires établis au cours de nos expériences figurent dans le graphique suivant (Fig. 16). En ce qui concerne les témoins, le quotient respiratoire s'est maintenu pratiquement constant pendant neuf heures. Les valeurs extrêmes obtenues (0,79 - 0,84) sont toutes comprises dans l'intervalle limité par la bande en grisé.

Chez les chenilles traitées, le Q.R. a varié selon la phase de l'intoxication.

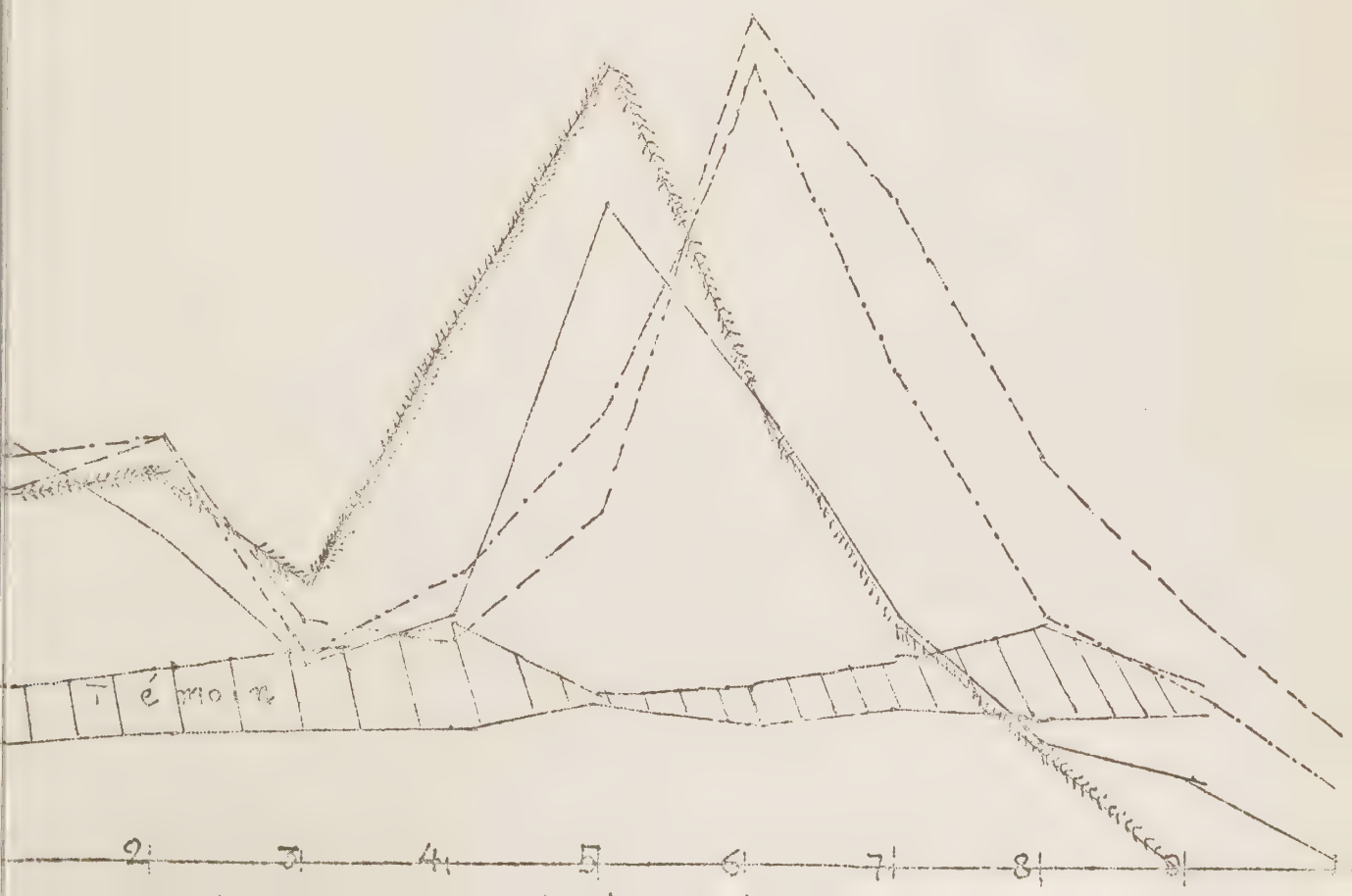
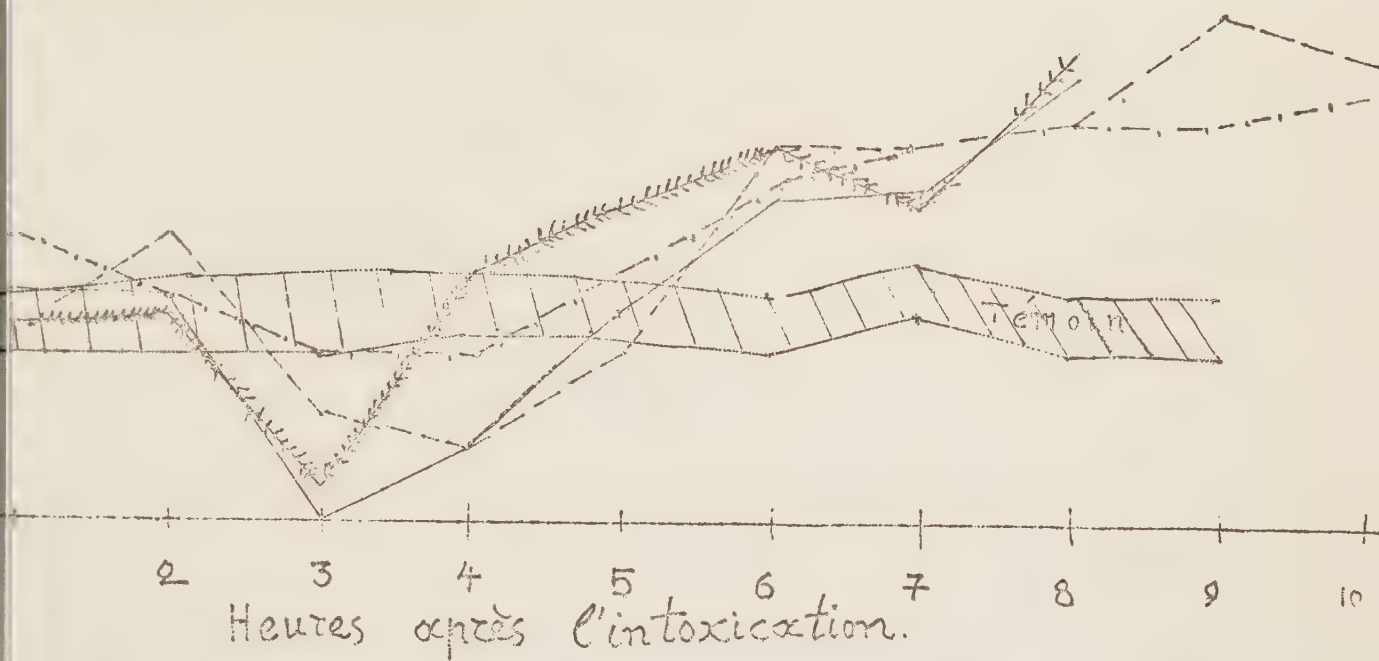
Pendant la première phase, dite phase d'excitation, le quotient respiratoire était comparable à celui des témoins bien que la consommation à oxygène soit déjà plus élevée.

Après deux ou trois heures on remarque une baisse notable du Q.R. qui atteint 0,70. Cette baisse correspond à la phase que nous avons décrite comme phase de repos. A ce moment la consommation d'oxygène est revenue à un niveau comparable à celle du témoin, ~~et la consommation d'oxygène.~~

Ensuite le quotient respiratoire remonte progressivement.



Fig. 16 - Modification du Quotient Respiratoire et courbes d'absorption d' O_2 des chenilles traitées au ECG.



Lorsque la consommation d'oxygène a atteint son maximum soit environ cinq fois celle du témoin, le Q.R. est de 0,9.

Par la suite la consommation d'oxygène décroît progressivement tandis que le Q.R. tend vers l'unité.

Le tableau suivant permet de suivre l'évolution du quotient respiratoire de huit chenilles.

TABLEAU XII

EXCITATION		PHASE DE REPOS		FIN DE CONVULSIONS	
Temps écoulé à partir de l'intoxication (exprimé en heures)	Q.R.	Temps écoulé à partir de l'intoxication (exprimé en heures)	Q.R.	Temps écoulé à partir de l'intoxication (exprimé en heures)	
I	0,74	4	0,91	8	
I	0,72	3	0,94	8	
I	0,70	3	0,94	8	
I	0,79	3	0,91	9	
I	0,72	3	0,95	9	
I	0,74	3	0,94	8	
I	0,71	3	0,94	8	
I	0,71	5	0,92	9	
Moyenne	0,73	Moyenne	0,93	Moyenne	
Ecart type	0,026	Ecart type	0,015	Ecart type	

C - PRECISION DE LA METHODE.

La précision des Q.R groupés dans le tableau ci-dessus n'est pas uniforme.

L'erreur expérimentale peut en effet être subdivisée :

a) - Erreur sur la détermination des volumes des fioles manométriques qui est pratiquement négligeable.

b) - Erreur sur l'estimation des volumes des gaz échangés durant la mesure des gaz.

Cette erreur dépend évidemment de la quantité absolue de gaz mesuré. Au cours des manipulations, nous nous sommes placés dans des conditions telles que cette erreur ne dépasse pas le niveau de 5 %.

c) - Erreur due à la technique utilisée.

L'intrapolation entre deux mesures successives de l'oxygène consommé, donne une approximation correcte dans les parties rectilignes de la courbe respiratoire ; elle se trouve en défaut si les maxima ou les minima de la courbe se trouvent encadrés par deux mesures. Le volume d'oxygène se trouve alors surestimé ou susestimé d'une quantité qui pourrait atteindre 10 à 15 % de la valeur réelle. Cependant les résultats groupés dans le tableau XII, nous montrent qu'une telle dispersion n'a jamais été atteinte au cours de nos mesures.

En effet l'étude statistique de la dispersion de ces résultats qui est la somme des erreurs expérimentales d'une part et des variations individuelles de sensibilité des insectes intoxiqués d'autre part, se révèle constamment inférieure à 5 %.

d) - Discussion.

Etant donné le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre thermique des fioles, les premières lectures de dénivellation furent effectuées une heure après l'intoxication. C'est ainsi que le début du phénomène a échappé à nos observations.

En travaillant avec le lindane et le D.D.T dans les mêmes conditions, nous avons constaté deux heures après l'intoxication, une consommation d'oxygène comparable à celle des chenilles témoins.

Or, chez les chenilles intoxiquées au P.C.C. pendant le même temps, la consommation d'oxygène est double de celle observée chez les témoins. C'est là peut-être qu'on doit chercher la cause de la baisse du métabolisme, que l'on note trois à cinq heures après le début de l'intoxication (Phase de repos).

Ce serait, dans ce cas, un phénomène similaire à celui décrit par Wigglesworth (79) dans une étude sur le vol des Drosophiles : Après un vol de courte période, l'insecte cesse de voler et passe quelque temps en repos.

En ce qui concerne l'hyperactivité des muscles l'intoxication du système nerveux peut d'ailleurs être comparée au vol.

La phase de repos serait semblable à un "knock down" résultant de l'hyperactivité brusque et intense des premières heures de l'intoxication.

Le quotient respiratoire pendant l'excitation s'est maintenu à des niveaux voisins des témoins ; le métabolisme des chenilles intoxiquées, pendant cette phase, reste donc plutôt lipidique ($Q.R = 0,82$).

En effet selon les tableaux de Lusk (44) un $Q.R$ de 0,82 correspondrait à une oxydation des lipides dans une proportion de 61,5 % du total des substances utilisées par la respiration.

Pendant la phase de repos, chez les insectes intoxiqués, le $Q.R.$ baisse considérablement ($Q.R. = 0,73$).

Est-ce une disparition des glucides immédiatement métabolisables qui obligerait l'insecte à consommer de plus en plus de matières lipidiques ? Dans ce cas selon les tableaux de Lusk la proportion des lipides consommés aurait atteint le niveau de 90 %.

L'épuisement des glucides immédiatement utilisables nous paraît peu probable étant donné le court intervalle qui existe entre la phase de repos et le début de l'intoxication.

Peut-être l'insecte continue-t-il à consommer les-mêmes proportions de glucides et de lipides ?

Ce qui pourrait être modifié ce serait, dans ce cas, le rythme d'échange des gaz avec l'extérieur.

Ce serait alors un phénomène de rétention du gaz carbonique, comparable à celui, décrit par divers auteurs, lors de l'herbation et de l'anaérobiose (18,21,23,60,62).

Cet hypothèse serait plausible étant donné que l'équilibre physiologique de l'insecte est perturbé après les deux premières heures de l'intoxication ; ce qui pourrait entraîner une modification dans le rythme de l'ouverture des stigmates.

Ce désordre physiologique se manifeste d'ailleurs par un affaiblissement du rythme cardiaque (14 à 18 battements de coeur par minute) et un immobilisme de l'insecte quasi total.

Après la phase de repos, l'excitation de l'insecte recommence. La courbe de la consommation d'oxygène est une courbe typique de tétanisation neuromusculaire. Après avoir atteint son maximum, la consommation d'oxygène diminue progressivement jusqu'à la mort de l'insecte.

Le quotient respiratoire pendant tout ce temps s'accroît.

La proportion des lipides consommés semblerait donc diminuer et neuf à dix heures après l'intoxication, le métabolisme serait presque totalement glucidique.

Etant donné que la chenille est restée à jeun depuis le début de l'intoxication, soit 10 à 11 heures, et que la consommation d'oxygène est cinq fois plus grande que chez les témoins pendant les convulsions, on pourrait attribuer ce changement du métabolisme à un épuisement progressif des substances lipidiques immédiatement métabolisables.

Pendant les convulsions le rythme cardiaque est très élevé (52 à 61 battements par minute) ce qui permet une irrigation massive des muscles en activité. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la modification du Q.R. :

a) - Les substances transportées sont composées surtout de glucides. Cette hypothèse est basée sur la remarque de Niemierko (53) que les glucides sont plus mobilisables que les lipides dans le corps d'un lépidoptère.

b) - Les muscles reçoivent un mélange de glucides et des lipides, mais étant donné l'épuisement de l'insecte, seules les substances glucidiques sont utilisées. Wigglesworth (79) émet l'hypothèse que les insectes utilisent au commencement de leur vol des glucides, car ces substances sont plus facilement et rapidement catabolisées que les lipides. D'autre part Weis-Fogh (7516) constate que le travail mécanique des muscles exige une énergie 10 % plus grande, lorsqu'elle provient des lipides.

Enfin, l'hypothèse d'un phénomène d'anabolisme, qui aurait pour résultat d'accroître le Q.R., nous paraît peu probable, étant donné l'état physiologique de l'insecte au dernier stade de l'intoxication. Tout de même nous avons cru opportun de signaler cette possibilité étant donné que l'insecte étudié est un lépidoptère et que la transformation des glucides en lipides est un phénomène très souvent observé (53) chez les insectes de cet ordre.

CONCLUSIONS

Avant de commencer le fractionnement du Polychlorocamphane nous avons dû mettre au point une méthode colorimétrique, permettant le dosage de traces de ce produit. Cette méthode était basée sur la réaction avec la pyridine en milieu alcalin.

Une autre méthode fut mise au point pour l'identification des fractions et le contrôle de la méthode colorimétrique ; elle était basée sur le dosage du chlore total dégagé de la molécule après minéralisation du P.C.C. en milieu alcalin. Au cours de ce travail nous avons pu constater que pour le P.C.C. l'hydrolyse des groupements chlorés était beaucoup plus difficile à réaliser que dans le cas du Toxaphène.

La mise au point d'une méthode de fractionnement nous a conduit à étudier le comportement du P.C.C. en chromatographie sur papier et sur couche de silice. Certains systèmes de solvants ont permis de mettre en évidence le caractère complexe du P.C.C.

La séparation proprement dite a été réalisée sur colonne de silice. Deux fractions principales ont été isolées : la fraction benzénique et la fraction étherée.

Ces fractions correspondent à des mélanges différents mais pas à des corps purs. Nous les avons caractérisés essentiellement par leur teneur en chlore.

Des différences secondaires furent également observées dans le spectre I.R., et la chromatographie en phase gazeuse.

.....

/...

Nous avons ensuite procédé à des essais biologiques en utilisant les deux fractions (benzéniques et éthérées) et le produit brut. Les insectes utilisés appartenaient à différentes familles et différents ordres.

La toxicité des différentes fractions varie selon l'insecte utilisé.

D'autre part nous avons observé une corrélation entre cette toxicité et la teneur en chlore.

Dans la troisième partie de notre travail nous avons étudié le mécanisme de l'intoxication sur deux insectes : Ceratite adulte et chenille de Cirphis.

En ce qui concerne le mode de pénétration de cet insecticide nous avons pu constater que le Polychlorocamphane peut pénétrer soit par voie orale, soit par la cuticule ; cependant sa toxicité est 5,4 fois plus grande lorsqu'il est administré par voie orale.

L'intoxication s'accompagne d'ailleurs d'une modification du rythme cardiaque, qui varie selon les phases de cette intoxication.

Quelques travaux préliminaires sur les hémocytes et sur l'épithélium de l'intestin moyen n'ont pas permis de mettre en évidence des modifications histologiques notables.

La symptomatologie de l'intoxication de la Ceratite adulte s'identifie à celles décrites par d'autres auteurs pour les poisons du système nerveux.

Chez la chenille de Cirphis nous avons observé une période ou phase de repos entre l'excitation des deux premières heures et les convulsions ; de plus la fin des convulsions est marquée par une régurgitation totale du contenu du tube digestif.

Nos essais sur la consommation d'oxygène pendant l'intoxication ont abouti aux résultats suivants :

..../...

.../...

- I - Chez la Ceratite intoxiquée au P.C.C. soit par voie orale, soit par contact, la courbe de consommation d'oxygène est la courbe typique décrite par Lord et autres auteurs.
- 2 - Dans les mêmes conditions pour la chenille de Cirphis, la courbe de la consommation d'oxygène présente un minimum trois heures après l'intoxication.
- 3 - Ce minimum n'apparaît pas lorsque ces mêmes chenilles sont intoxiquées au lindane ou au D.D.T. ; dans ce cas la courbe est comparable à celle des Ceratites traitées au P.C.C.

De ces résultats on peut donc conclure que le minima observé dans la courbe de consommation d'oxygène est propre à la chenille de Cirphis traitée au Polychlorocamphane.

Le quotient respiratoire des chenilles de Cirphis intoxiquées au P.C.C s'est maintenu, pendant les deux premières heures, au niveau de celui des chenilles témoins (0,82).

Pendant la phase de repos, le Q.R s'abaisse au-dessous des valeurs observées pour les témoins (témoins 0,82, traitées 0,73). L'explication qui semble la plus valable serait une modification du rythme de l'ouverture des stigmates qui aurait comme conséquence la retention du gaz carbonique.

Le Q.R. s'accroît ensuite pendant la phase des convulsions et atteint des valeurs proches de l'unité, un peu avant la mort de la chenille. Cette augmentation du Q.R. correspondrait à un métabolisme presque totalement glucidique.

Parmi les hypothèses qui pourraient être envisagées pour expliquer cette remontée importante du quotient respiratoire nous retiendrons les suivantes :

..../...

.../...

a) - Epuisement des matières lipidiques immédiatement utilisables.

b) - Mobilisations des substances de réserves orientées surtout sur les métabolites glucidiques.

c) - Mobilisation des réserves lipidiques et glucidiques mais utilisation préférencielle des substances dont le métabolisme exige peu d'énergie : les glucides.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

-

- GADDUM J.H., Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun., Lond., N° 183, (1933)
- GILMOUR D., Jour. Cellular and Comp. Physiol., 15, 331, (1940)
- GLYNNE J.G.D., CONNELL J.U., Ann. Appl. biol. 41, 271, (1954)
- GUNTHER R.A., BLINN R.C., Analysis of Insecticides and Acaricides, Interscience, N.York, (1955)
- HARVEY G.T., BROWN A.W.A., Canad. J. Zool., 29, 42, (1951)
- HOSKINS W.M., J.Econ. Entom., 25, 1212, (1932)
- HOSKINS W.M., Analyt. Chem., 24, 555, (1952)
- JACQUES J., MATHIEU J.P., Bull. Soc. Chim. France., 94, (1946)
- JOHNSON D.P., J. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 38, 153, (1955)
- KENYON W.C., Anal. Chem. 24, 1197, (1952)
- KIRCHNER J., MILLER J., KELLER G., Analyt. Chem. 23, 420, (1951)
- KLEIN A.K., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 39, 242, (1956)
- KRLJGSMA B.J., KRLJGSMA N.E., Nature, 165, 936, (1950)
- LAUG E.P., J.Pharmacol. Exptl. Therap., 86, 324, (1946)
- LAUG E.P., J.Pharmacol. Exptl. Therap., 93, 277, (1948)
- LORD K.A., Ann. Appl. Biol. 36, 113, (1949)
- LORD K.A., Ann. Appl. Biol. 37, 105, (1950)
- LUSK G., Elements of the Science of Nutrition, Sauders and C^a, Philadelphia, (1928)
- MEINHARD J.E., HALL N.F., Analyt. Chem., 21, 185, (1949)
- MILLER J., KIRCHNER J., Analyt. Chem., 25, 1107, (1953)
- MITCHELL L., PATTERSON W., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 36, 1183, (1953)
- MITCHELL L., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 37, 530, (1954)
- MITCHELL L., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 39, 484, 980, (1956)
- MOSHER H.S., Heterocyclic Compounds, Vol. I, Wiley, N.York, (1950)
- MULLINS L., Science, 118, (1955)
- NEWMAN J.F., Trans. IX th int. Congr. Ent. 2, 331, (1953)
- NIEMIERKO W., IV th int. Congr. of Biochemistry, Vienna, (1958)
- NOLAN K., WILCOXON F., Agr. Chemicals, 5, 53, (1960)
- ORSER W., BROWN A., Canad. J. Zool., 29, 54, (1951)
- PAL R., Indian J. Malar., 3, 29, (1954)
- PILAT M., Bull. Ent. Res. 26, 165, (1935)
- PRADHAN S., Nature, 170, 619, (1952)
- PUNT A., Physiol. Comp. Oecol., 4, 132, (1956)

- PUNT A., PARSER W.J., KUCHLEIN J., Biol. Bull., 112, 108, (1957)
- RICHARDS A., CUTKOMP L., J. N.Y. Entomol. Soc., 53, 313, (1945)
- ROEDER K.D., Insect Physiology, Wiley, N.York, (1953)
- ROTMAN M.N., TARASOVA K.L., IVANOVA P.G., Rev. Appl. Ent., 25, 799, (1936)
- RUSK H., FAHEY J., J. Agr. Food Chemistry, 4, 263, (1961)
- SCHNEIDERMAN H.A., WILLIAMS C.M., Biol. Bull., 105, 320, (1953)
- SLAMA K., Věstník Československé společnosti Zoologické XXII, 4, 334, (1958)
- STEPANOW A., Ber., 39, 4056, (1906)
- TEN CATE J., Arch. Neerl. Physiol., 12, 327, (1928)
- TRAPFMANN W., NITSCHKE G., MITTEIL. Biol. Reichsanstalt, 46, 61, (1939)
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F., Manometric Techniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis, (1957)
- UMHOFER R.R., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 383, (1943)
- VIEL G., CHANCOGNE M., Phytatrie-Phytopharmacie, 6, 217, (1957)
- VOSKRESENSKAYA A.K., Summ. Sci. Res. Wk Inst. Pl. Prot., 380, (1936)
- WAY M.J., Ann. Appl. Biol. 41, 77, (1954)
- WEIS-FOGH T., Phil. Trans. R. Soc., 237, I, (1952)
- WEIS-FOGH T., IX th Cong. int. Entom., (1952)
- WEISMANN R., Mitt. Schweiz ent. Ges., 20, 484, (1947)
- WIGGLESWORTH V.B., The Principles of Insect Physiology, Methuen, London, (1961)
- WIGGLESWORTH V.B., Jour. Exptl. Biol., 26, 150, (1949)
- WOKE P.A., J. Agr. Res., 57, 707, (1938)
- WOKE P.A., J. Agr. Res., 61, 321, (1940)
- ZINCKE T., HEUSER G., MOLLER W., Ann. Chem. Liebigs, 333, 296, (1904)

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Les insecticides dans le sol. Evolution.

Action sur la Faune et sur la Flore.

Vu :

Les Membres du Jury,

NIGON

CHOPIN

LEGAY

Vu et approuvé :

Pr Le Doyen de la Faculté des Sciences,

L'Assesseur

G.MESNARD

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 17 Décembre 1963

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P.LOUIS

